

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Sección de Biológicas.



TESIS DOCTORAL

**Modelos experimentales para el estudio de las
interrelaciones de hidratos de carbono y grasas : lactancia,
ayuno, hipotiroidismo e hipertiroidismo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ana María Aranda Iriarte

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Serie A - n.º 184

SECCION DE BIOLOGICAS

**MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL
ESTUDIO DE LAS INTERRELACIONES
DE HIDRATOS DE CARBONO Y GRASAS:
LACTANCIA, AYUNO, HIPOTIROIDISMO
E HIPERTIROIDISMO**

TESIS DOCTORAL

por

ANA MARIA ARANDA IRIARTE



**Publicaciones de la Facultad de Ciencias
MADRID 1973**

R.19.182

ISBN 84-600-5693-7

Depósito Legal: M. 14.580 - 1973

Impreso por el Servicio de Publicaciones de la Facultad de Ciencias
Universidad Complutense de Madrid

Esta TESIS DOCTORAL fue presentada por DOÑA ANA MARIA ARANDA IRIARTE en la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense de Madrid, para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS. Fue dirigida por el Prof. Dr. D. EMILIO HERRERA CASTRILLON.

Leída el día 16 de enero de 1973 ante el Tribunal constituido por los siguientes Profesores

Dr. D. RAFAEL ALVARADO BALLESTER	Presidente
Dr. D. ARSENIO FRAILE OVEJERO	Vocal
Dr. D. ANGEL MARTIN MUNICIO	Vocal
Dr. D. EMILIO HERRERA CASTRILLON	Vocal
Dr. D. JUAN RAMON LACADENA CALERO	Vocal-secretario

en el que actuó como Ponente el Catedrático de dicha Facultad Dr. D. ARSENIO FRAILE OVEJERO, obtuvo la calificación de SOBRESALIENTE CUM LAUDE.

I N D I C E

Página

CLAVE DE ABREVIATURAS	7
INTRODUCCION	9
1) ALTERACIONES METABOLICAS EN LA LACTANCIA DE LA RATA	12
2) PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO DE LAS INTERRELACIONES DE HIDRATOS DE CARBONO Y GRASAS DURANTE LA LACTANCIA DE LA RATA	19
3) ALTERACIONES METABOLICAS EN RATAS HIPO E HIPERTIROIDEAS	23
4) PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO DE LAS INTERRELACIONES DE HIDRATOS DE CARBONO Y GRASAS EN RATAS HIPOTIROIDEAS E HIPERTIROIDEAS ..	29
MATERIALES Y METODOS	31
I) ANIMALES	33
II) CONDICIONES AMBIENTALES	33
III) SITUACIONES EXPERIMENTALES	33
A- Ratas lactantes	33
B- Ratas hipo e hipertiroideas	34
IV) DIETAS	36
V) SACRIFICIO	37
VI) TOMA DE MUESTRAS	38
1- Sangre	38
2- Hígado	38
3- Hipófisis	39

	<u>Página</u>
VII) VALORACIONES EN SANGRE	39
1- Desproteínización	39
2- Valoración de glucosa	40
3- Valoración de cuerpos cetónicos	41
4- Valoración de insulina	43
5- Valoración del PBI	45
VIII) VALORACIONES EN HIGADO	47
A- PROCESOS EN HIGADO NO CONGELADO	48
a- Determinación de la celularidad hepática	48
b- Cortes histológicos	49
c- Determinación del agua	49
B- PROCESOS EN HIGADO CONGELADO	50
a- Extracto de hígado en ácido perclórico..	50
a-1 Valoración de Ac-CoA	50
a-2 Valoración de ácido pirúvico y ácido	
citríc	53
a-3 Valoración de ácido láctico	55
b- Proceso del hígado en KOH: valoración	
del glucógeno	56
c- Proceso del hígado en cloroformo-meta-	
nol	57
c-1 Valoración de ácidos grasos libres y	
ácidos grasos totales por el método	
de Ho y Meng	58
c-2 Valoración de los ácidos grasos tota	
les por el método de Duncombe	61
c-3 Valoración del fósforo de fosfolípi-	
dos	62
c-4 Valoración de proteínas	64
c-5 Valoración del fósforo del DNA	65

IX) GLUCONEOGENESIS Y FORMACION DE LIPIDOS "IN VI- VO" A PARTIR DE PIRUVATO	56
1- Inyecciones	67
a- Animales de 5 días	67
b- Animales de 10 días	68
c- Animales de 20 días	68
d- Animales de 30 días	69
e- Animales adultos	69
2- Toma de muestras	69
3- Incorporación de Radiactividad a la sangre total	70
4- Formación de Glucosa-C ¹⁴ en plasma	71
Activación de la Duolita	71
Preparación de las microcolumnas	72
Pruebas de recuperación	73
Expresión de los resultados	74
Valoración de glucosa fría	75
Actividad específica	75
5- Formación de Glucógeno-C ¹⁴ en hígado	75
Expresión de los resultados	75
Valoración de glucógeno frío	76
Actividad específica	76
6- Gluconeogénesis total	76
7- Formación de Lípidos-C ¹⁴ en hígado	76
8- Composición de los líquidos de centelleo ..	77
X) VALORACIONES EN HIPOFISIS: DETERMINACION DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO	79
XI) CALCULOS ESTADISTICOS	81

	<u>Página</u>
RESULTADOS	85
A- LACTANCIA Y METABOLISMO INTERMEDIARIO	87
1- Peso del cuerpo y del hígado	87
2- Celularidad del hígado	88
3- Composición del hígado	95
4- Metabolitos plasmáticos	100
5- Estado estacionario de metabolitos regulado <u>res</u> en el hígado	105
6- Gluconeogénesis "in vivo"	109
a- Radiactividad total en sangre	109
b- Formación de glucosa-C ¹⁴	110
c- Formación de glucógeno-C ¹⁴	116
d- Gluconeogénesis total	118
e- Actividad específica de glucosa y glucó- geno	120
7- Lipogénesis "in vivo"	131
B- ESTADO TIROIDEO Y METABOLISMO INTERMEDIARIO ..	135
1- Niveles plasmáticos de PBI y hormona tiro- tropía	136
2- Niveles de hormona de crecimiento hipofisa- ria y peso corporal	140
3- Peso, celularidad y composición del hígado.	143
4- Estado estacionario de metabolitos regulado <u>res</u> en el hígado	148
5- Niveles plasmáticos de glucosa, insulina y cuerpos cetónicos	152
DISCUSION	159
CONSIDERACIONES GENERALES	161
ALTERACIONES METABOLICAS EN RATAS LACTANTES	162

ALTERACIONES METABOLICAS EN EL HIPO E HIPERTIROI	
DISMO	177
Animales intensamente hipotiroideos	177
Compensación del intenso hipotiroidismo median	
te la administración de pequeñas dosis de tiro	
xina exógena a animales tiroidectomizados	182
Animales hipertiroideos	185
REGULACION DEL METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO	
Y GRASAS EN LAS DISTINTAS CONDICIONES EXPERIMENTA	
LES AQUI ESTUDIADAS	190
RESUMEN Y CONCLUSIONES FINALES	199
BIBLIOGRAFIA	209

C L A V E D E A B R E V I A T U R A S

AD: Agua destilada

ADD: Agua destilada y desionizada

ANSA: Acido 1-2-4 amino-naftol-sulfónico

CL: Citrato liasa

DO: Densidad Óptica

EDTA: Acido etilén-diamin-tetracético

GH: Hormona del crecimiento hipofisaria

LDH: Láctico dehidrogenasa

MDH: Málico dehidrogenasa

OAA: Acido oxalacético

PBI: Iodo ligado a las proteínas plasmáticas

P-DNA: Fósforo del DNA

P-fósfolípidos: Fósforo de los fosfolípidos

T₄: Tiroxina

TCA: Acido tricloroacético

TRH: Hormona hipotalámica liberadora del TSH

TSH: Hormona tirotrópa hipofisaria

Tris: Tri-hidroxi-metil amino-metano

INTRODUCCION.

El objetivo de la presente tesis es el estudio de las interrelaciones de los metabolismos de hidratos de carbono y grasas y su regulación en ciertas situaciones fisiológicas o patológicas en las que se encuentran alteradas.

La gluconeogénesis, glicolisis, cetogénesis y lipogénesis hepáticas pueden ser influenciadas por los efectos reguladores que ejerce el contenido estacionario de determinados metabolitos (tales como el Ac-CoA, ácido cítrico y ácidos grasos libres) dentro de las células, sobre ciertas actividades enzimáticas. Por experimentos realizados "in vitro" son conocidos los efectos alostéricos del Acetil-CoA sobre el primer enzima de la gluconeogénesis: la piruvato carboxilasa (Keech y Utter, 1963) y sobre la piruvato dehidrogenasa (Garland y Randle, 1964); del ácido cítrico sobre la Ac-CoA carboxilasa (Martin y Vagelos, 1962) y la fosfofructokinasa (Passonneau y Lowry, 1963); y de los ácidos grasos sobre la glucokinasa, la piruvatokinasa, los enzimas del shunt de las hexosas-monofosfato (Weber y Col., 1966) y la Acetil-CoA carboxilasa (Dorsey y Porter, 1968).

Debido a la complejidad de los mecanismos de regulación metabólica, los datos existentes en la literatura no permiten decidir si los anteriores sistemas de control se dan o no en situaciones "in vivo".

Para el estudio de estos mecanismos de regulación hemos utilizado la lactancia, el ayuno y el hipo e hipertiroidismo en los que relacionamos el estado estacionario de metabolitos reguladores con las velocidades de las vías metabólicas donde actúan (gluconeogénesis, lipogénesis, etc.)

2) ALTERACIONES METABOLICAS EN LA LACTANCIA DE LA RATA

Durante la vida intrauterina la principal fuente de energía del feto es la glucosa que recibe de la madre a través de la placenta (Herrera y Col., 1969). A partir de dicho metabolito el feto, no solamente satisface sus necesidades energéticas, sino que logra fabricar lípidos que los reserva principalmente en forma de grasa marrón y el exceso de glucosa lo acumula en forma de glucógeno hepático, llegando a concentraciones realmente altas.

En el nacimiento, la rata sufre un drástico cambio en su alimentación. Durante los primeros días de vida extrauterina utiliza las reservas almacenadas durante la última parte de la vida fetal y comienza a lactar. La leche de rata puede ser considerada como una dietética en grasas y proteínas (69% y 23%) y pobre en hidratos de carbono (8%) (Dymsza y Col., 1964). La concentración de lactosa es solamente alrededor de un 3% (peso/volumen) y, por consiguiente, los carbohidratos pueden facilitar menos del 10% de las calorías totales requeridas por el animal recién nacido (Hahn y Col., 1961 a). Como la utilización de los aminoácidos procedentes de la digestión de las proteínas

de la leche para la síntesis de nuevas proteínas es muy alta (Hahn y Col., 1961 b), la oxidación de lípidos parece ser la principal fuente de energía durante la lactancia.

A partir de los 13 ó 14 días de edad, la rata empieza a mezclar la leche con la comida de adultos y a los 30 días su alimentación es prácticamente como la de un adulto, es decir, una dieta rica en hidratos de carbono (46.5%) y pobre en grasas (3.8%).

Se conocen gran número de alteraciones metabólicas originadas al variar la relación hidratos de carbono/grasas en la dieta, como consecuencia de la adaptación de un gran número de enzimas. Así por ejemplo, cuando esta relación es baja (dieta grasa), hay una disminución de la utilización de glucosa (Christophe, 1961), un aumento de la gluconeogénesis hepática y una alteración en la concentración de lípidos en dicho tejido (Blázquez y Col., 1971).

Estas adaptaciones enzimáticas se presentarán en la lactancia de una manera totalmente fisiológica y como consecuencia del paso de la alimentación a expensas de la leche materna a la dieta de adulto. Esta es, por lo tanto, una situación ideal en la que, sin someter a los animales a ningún tipo de tratamiento, las interrelaciones hidratos de carbono/grasas van cambiando en función de los sustratos utilizados por el animal.

En efecto, en los últimos días de la vida fetal el glucógeno se almacena en gran cantidad en el hígado, alcanzando valores de hasta un 10% (Ballard y Oliver, 1963; Avdalovic y Col., 1970), durante las primeras horas

después del nacimiento los niveles caen drásticamente y permanecen bajos durante toda la lactancia. Esto debe estar relacionado con la actividad de la glucosa - 6 - fosfatasa, que es muy baja en el feto, permitiendo que se acumule el glucógeno. Sin embargo, durante la lactancia la actividad de este enzima está muy elevada y los niveles de glucógeno permanecen bajos (Dawkins, 1966). Estos cambios en la concentración de glucógeno se producen también en otras especies animales como el cobaya y ratón (Kornfeld y Brown, 1962; Burton y Col., 1970).

Por otro lado, la actividad de algunos enzimas relacionados con la utilización de glucosa disminuyen desde el final de la gestación y solamente alcanzan los niveles del adulto tras el destete (Vernon y Walker, 1968). Asimismo, la glucokinasa es indetectable hasta el día 16 de vida postnatal (Walker y Holland, 1965).

Como consecuencia de esta falta de enzimas glicolíticos, la utilización de glucosa durante la lactancia es muy baja, alrededor solamente de un 50% de la que existe tras el destete (Vernon y Walker, 1972 a).

Al contrario de lo que sucedía con la glucólisis, los enzimas de la gluconeogénesis son más activos en el hígado de los animales lactantes que en el de los adultos (Ballard y Hanson, 1967; Yeung y Oliver, 1967; Vernon y Walker, 1968). Así por ejemplo, es el caso de las actividades de la fructosa 1,6 difosfatasa y glucosa 6 fosfatasa. La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa es muy



baja en el feto mientras que sufre un incremento de veinticinco veces en el nacimiento, habiéndose sugerido incluso que la aparición de este enzima inicie un rápido aumento de la gluconeogénesis (Ballard y Hanson, 1967).

La gluconeogénesis renal aparece ya en el feto aunque alcanza niveles más altos en la lactancia (Zorzoli y Col., 1969). Sin embargo, la gluconeogénesis hepática no existe en la vida fetal, apareciendo en los primeros días de la vida extrauterina. La capacidad "in vitro" de producir glucógeno a partir de aminoácidos aparece también con el nacimiento y es máxima a los 5 días de edad, disminuyendo gradualmente durante la lactancia hasta alcanzar los niveles del adulto (Yeung y Oliver, 1967). Los animales de un día de edad tienen ya capacidad de producir glucosa "in vivo" a partir de la inyección de diversos sustratos radiactivos (pirúvico, láctico, aspártico), cosa que no sucede con el feto a término (Philippidis y Ballard, 1969). Últimamente se ha demostrado que la gluconeogénesis "in vivo" a partir de lactato, es más alta en los animales de 2 y 10 días que en los de 30 días que ya han sido destetados (Vernon y Walker, 1972 b).

Durante la lactancia también el metabolismo de los lípidos sufre grandes cambios. La lipogénesis, medida como incorporación de glucosa-C¹⁴ o acetato-C¹⁴ a lípidos, es alta en el feto y en el animal adulto, pero hay una rápida supresión de la lipogénesis hepática tras el nacimiento y permanece baja hasta los 20 días de edad en que empiece

za a aumentar nuevamente (Villée, 1958; Ballard y Hanson, 1967; Taylor y Col., 1967). Esta elevación coincide con el cambio de dieta y es paralela a la actividad de la citrato liasa hepática que, a partir de los 20 días, comienza a aumentar hasta alcanzar antes de los 30 días los niveles iguales a los existentes en el animal adulto (Ballard y Hanson, 1967). A pesar de la baja lipogénesis los niveles de ácidos grasos en plasma permanecen altos durante la lactancia debido a la gran cantidad de lípidos ingeridos en la leche (Page y Col., 1971). Al contrario de lo que sucedía con la glucosa, la utilización de ácidos grasos está aumentada durante este período, siendo máxima a los 5 días y empieza a disminuir con el destete (Lockwood y Bailey, 1970). Como consecuencia de estos cambios en el metabolismo de los ácidos grasos se producen alteraciones en la cetogénesis. Los enzimas de formación de cuerpos cetónicos están elevados durante la lactancia (Lockwood y Bailey, 1971) y durante este período hay una formación incrementada de cuerpos cetónicos por cortes de hígado (Drahota y Col. 1964) y en homogenados de hígado a partir de palmitato (Augenfeld y Fritz, 1970), en relación con la que ocurre en el feto y en adultos (Lee y Fritz, 1971). Como consecuencia de esta activación en la cetogénesis al poco tiempo del nacimiento, los cuerpos cetónicos circulantes que al nacer son bajos, aumentan en el animal de un día de edad alimentado "ad libitum" hasta valores que aparecen en el adulto solamente tras 48 horas de ayuno. Esta cetosis se

mantiene hasta el destete en que empieza a disminuir hacia los niveles del adulto (Drahota y Col., 1964; Page y Col., 1971). En cuanto a la utilización de los cuerpos cetónicos parece ser que cortes de cerebro de ratas lactantes los utilizan más rápidamente que los adultos (Drahota y Col., 1965) y de hecho, algunos de los enzimas claves en la utilización de cuerpos cetónicos están muy elevados en el cerebro de animales lactantes, aunque esto no sucede en riñón ni corazón. El cerebro es, pues, potencialmente el mayor sitio de utilización de los cuerpos cetónicos en la infancia, lo que no ocurre en el adulto en el que la principal y casi única fuente de energía para el cerebro es la glucosa.

Estos cambios metabólicos repercuten y/o son consecuencia de las conocidas alteraciones hormonales que ocurren durante este período. Así, por ejemplo, la insulina circulante que era muy alta en el feto a término cae drásticamente en el primer día de vida postnatal, mientras sucede lo contrario con el glucagón (Girard y Col., 1972) y permanece a niveles más bajos que en el animal adulto hasta el destete (Blázquez y Col., 1970). Hay un período de activa secreción de glucocorticoides que comienza hacia el día 10 del nacimiento (Levine y Mullins, 1966). La hormona de crecimiento en la hipófisis no aparece por radioinmunoensayo hasta el día 19 de vida fetal y el contenido hipofisario aumenta rápidamente a partir del segundo día de vida extrauterina (Birge y Col., 1969).

A pesar de esta amplia bibliografía existente sobre las alteraciones metabólicas durante la lactancia, existen enormes lagunas que impiden el comprender los mecanismos de regulación de las mismas.

Así por ejemplo, no existen datos en la literatura sobre los cambios metabólicos en animales lactantes en ayunas, lo cual nos impide conocer los recursos energéticos y la capacidad catabólica de estos animales.

Muchos de los estudios realizados en animales lactantes con sustratos radiactivos, se han realizado utilizando condiciones experimentales en las que una diferencia en la concentración endógena de metabolitos entre los animales en estudio, podría justificar diferencias que aparentemente se han achacado a cambios en actividad metabólica.

Por último, no hay datos en la literatura sobre la concentración hepática de metabolitos reguladores, ni siquiera de la composición intrínseca de dicho tejido, que nos permitiría un mejor conocimiento de los cambios metabólicos que aparecen en esta situación fisiológica.

Con el fin de obtener un conocimiento más amplio del metabolismo en la rata lactante hemos intentado estudiar los puntos anteriormente citados (efecto del ayuno, concentración hepática de metabolitos, etc.) en la presente tesis.

2) PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO DE LAS INTERRELACIONES DE HIDRATOS DE CARBONO Y GRASAS DURANTE LA LACTANCIA DE LA RATA

Para este estudio hemos utilizado animales de 5, 10, 20 y 30 días de ambos sexos y los hemos comparado con animales adultos. Hemos escogido estas edades por parecer-nos muy significativas en el desarrollo postnatal de la rata. A los 5 días los animales se están alimentando de la leche materna, aunque aún disfrutan de reservas endógenas acumuladas durante el período embrionario. Los 10 días después del nacimiento representan un estadio en que se ha producido un considerable aumento en la cantidad de leche ingerida, pero ésta es todavía la única dieta que recibe el animal. A los 20 días de edad el animal no ha dejado aún de mamar pero completa su dieta consumiendo también la comida que tiene la madre a su disposición, hemos visto además que esta edad es crítica ya que en ella aparecen drásticos cambios metabólicos. Los 30 días representan una edad en que el destete es prácticamente completo, pero aún no han empezado a aparecer diferencias sexuales en parámetros metabólicos.

En todos los grupos mencionados hemos realizado el estudio en ratas alimentadas "ad libitum" y en animales sometidos a un ayuno previo de 24 horas con la finalidad de conocer también los mecanismos de regulación, a partir de sustratos endógenos cuando las necesidades metabólicas es-

tán aumentadas. El ayuno nos ha parecido muy interesante ya que, aunque sus efectos en el animal adulto están muy estudiados, del animal lactante no se encuentran prácticamente datos en la literatura, como ya hemos indicado anteriormente.

En el hígado de estos animales hemos valorado el estado estacionario de metabolitos reguladores: el Ac-CoA, ácido cítrico, ácido pirúvico y ácido láctico. El Ac-CoA nos interesó por ser el producto final de la β -oxidación de los ácidos grasos, ser sustrato para lipogénesis y para síntesis de cuerpos cetónicos y ácido cítrico (Fig. 1), aparte de su efecto activador sobre la piruvato carboxilasa e inhibidor sobre la piruvato dehidrogenasa. El ácido cítrico por ser la vía de entrada del Ac-CoA en el ciclo de Krebs, por su acción inhibidora sobre la fosfofructokinasa y su efecto activador sobre el primer enzima para la lipogénesis: la acetil-CoA carboxilasa. Los ácidos pirúvico y láctico nos interesan porque la relación láctico/pirúvico representa la de NADH/NAD citoplásmica (Williamson y Col., 1967). Cuando esta relación es alta se favorece la formación de 3-fosfo-gliceraldehído y consecuentemente la gluconeogénesis, mientras que al ser baja se favorece la de ácido 1-3-difosfoglicérico y consecuentemente la glicólisis.

Como índices generales del metabolismo de hidratos de carbono y lípidos hemos valorado también glucógeno y ácidos grasos libres y esterificados en hígado.

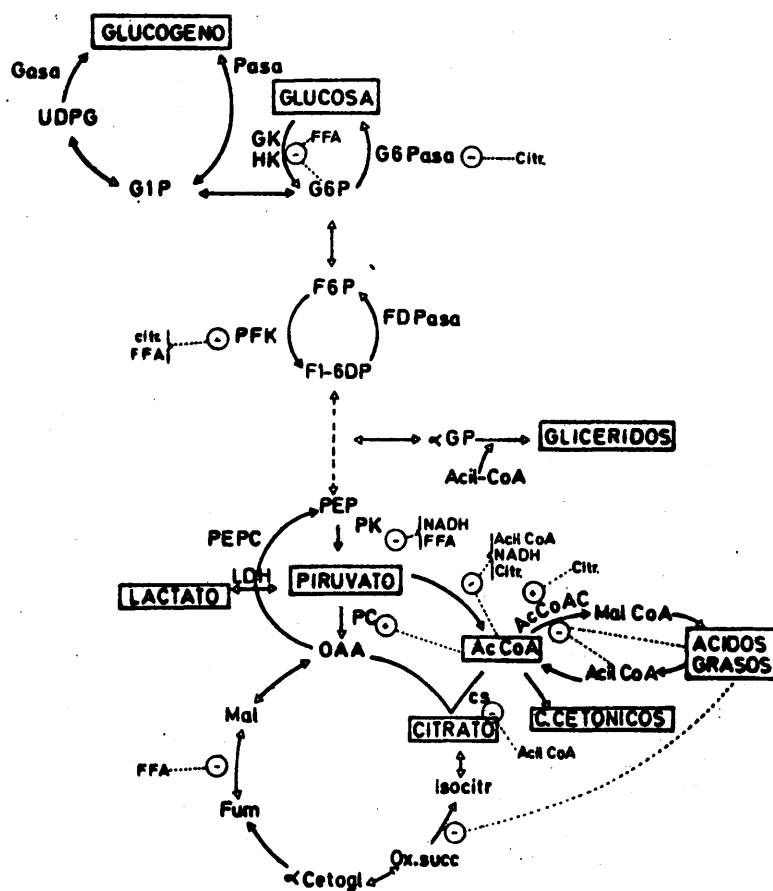


FIG. 1

En plasma se determinaron glucosa y cuerpos cetónicos.

En vista de que durante la lactancia hay grandes cambios en el peso del hígado y su relación con el del animal completo, hemos estudiado la celularidad hepática y la composición intrínseca del hepatocito. Como índices de celularidad hemos utilizado el conteo de núcleos y la concentración de DNA y hemos contado la proporción de células mono y binucleadas existente en los hígados de los animales de distintas edades. En cuanto a la composición del hígado hemos valorado el agua, las proteínas y los fosfolípidos. Esta parte del trabajo se ha realizado en colaboración con el Dr. E. Blázquez, al que quiero expresar mi agradecimiento.

Con el fin de relacionar el estado estacionario de los metabolitos reguladores con las vías sobre las que actúan, hemos realizado otra serie de experimentos en los que hemos inyectado piruvato-3-C¹⁴ a los animales de distintas edades y hemos medido la incorporación de radiactividad a la sangre, la gluconeogénesis "in vivo" (es decir, la formación de glucosa radiactiva en plasma más glucógeno radioactivo en hígado), la actividad específica de la glucosa y el glucógeno y la formación de lípidos radiactivos en hígado, tanto lípidos totales como la fracción del glicerol de los glicéridos.

En este experimento hemos dedicado especial atención a las posibles diferencias en la dilución del

sustrato radiactivo»; como indicamos anteriormente, diferencias endógenas del "pool" de pirúvico entre los distintos grupos experimentales podrían enmascarar los resultados por variar la actividad específica del trazador. Para subsanar este posible artefacto hemos realizado el experimento doble: con concentración traza del precursor radiactivo y con concentraciones sustrato, suficientes para compensar los posibles cambios de su concentración "in vivo" entre los grupos.

3) ALTERACIONES METABOLICAS EN RATAS HIPO E HIPERTIROIDEAS

Es bien conocido el hecho de que el hipo e hiper tiroidismo vienen acompañados de cambios en el metabolismo intermedio, especialmente en lo que se refiere a las interrelaciones hidratos de carbono/grasas (Metzger y Freinkel, 1971; Freinkel y Metzger, 1971) y, por consiguiente, constituyen otro modelo para el estudio de los mecanismos de regulación de dichas interrelaciones.

Este modelo es de gran interés para el mejor comcimiento no sólo de las alteraciones bioquímicas que se presentan cuando varían los niveles circulantes de hormonas tiroideas en particular, sino también, en general, de todo el metabolismo intermedio.

Desde hace unos diez años se vienen estudiando en nuestro laboratorio las alteraciones endocrinas y metabólicas que se presentan en el hipo e hipertiroidismo. Se

han utilizado diversos procedimientos experimentales para lograr cambios graduales en la función tiroidea y relacionarlos con las alteraciones metabólicas que aparecen en tejidos extratiroideos. Así, se han utilizado bociógenos (Herrera y Col, 1963, 1968 a y 1968 b), tiroidectomía y tratamiento con distintas dosis de tiroxina exógena (Herrera y Col. 1963, 1968 a), dieta pobre en iodo (Castro y Col. 1972), etc.

Aunque existe una amplia bibliografía sobre el tema, la influencia de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo intermediario no se ha comprendido completamente. Se sabe que en el hipotiroidismo todo ritmo metabólico disminuye, de forma que se presenta la asociación de un lento catabolismo y anabolismo que repercute en el establecimiento de un nuevo estado estacionario en el que algunos metabolitos se mantienen a concentraciones iguales que la de los animales normales. (Metzger y Freinkel, 1971). Así, por ejemplo, las concentraciones de glucógeno hepático (Castro 1972) y glucosa plasmática (Lamberg, 1965; Castro, 1972), son normales en los animales hipotiroideos a pesar de que se conoce que existen grandes cambios en la síntesis y utilización de la glucosa en estos animales. La utilización de glucosa en el hipotiroidismo, se encuentra disminuida en algunos tejidos (Shames y Col. 1968), aunque es normal en el tejido adiposo (Bray y Goodman, 1968), también se ha descrito una disminuida glicolisis hepática

(Bargoni y Col, 1968). Por otra parte algunos enzimas de gluconeogénesis, como la piruvato carboxilasa y la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (Böttger y Col., 1970) se encuentran disminuidas en animales tiroidectomizados y se elevan tras la administración de hormonas tiroideas. Como consecuencia de la disminución de enzimas claves de gluconeogénesis en animales hipotiroideos, la actividad de dicha vía metabólica parece estar disminuida (Menahan y Wieland, 1969). La situación no está, sin embargo, tan clara ya que la gluconeogénesis en los animales hipotiroideos es igual a la de los normales, cuando se corrige por la distinta masa corporal de ambos grupos (Castro, 1972).

Lógicamente, también el metabolismo lipídico está afectado en el hipotiroidismo, aunque la concentración plasmática de ácidos grasos libres, tras cortos períodos de ayuno, es normal o ligeramente disminuida en sujetos hipotiroideos (Hamburger y Col. 1963; Harlan y Col., 1963) y de hecho, los niveles circulantes de cuerpos cetónicos en animales tiroidectomizados son iguales a los de ratas intactas (Castro, 1972). En el hipotiroidismo hay una tendencia a acumular grasas (Scow, 1951), que no parece deberse a un aumento de la lipogénesis (Bates y Col., 1955; Masoro, 1962), sino más bien a una disminución de su degradación (Debbons y Schwartz, 1961). La actividad lipolítica del tejido adiposo parece estar disminuida en animales hipotiroideos (Fisher y Ball, 1967) aunque esto no ha sido con-

firmado (Vaughan, 1967).

El ayuno parece romper todo este equilibrio metabólico, lo que se manifiesta por una intensa hipoglucemia en los animales hipotiroideos (Castro, 1972), a pesar de que presentan una mayor activación de los procesos lipolíticos que los animales normales (Montoya, 1972). Hay muy pocos resultados relacionados con la actividad metabólica de estos animales en el ayuno, pero los datos anteriormente citados, parecen indicar que, cuando se les priva de alimento, llevan a cabo un gran reajuste metabólico que les permite la supervivencia a pesar de ese descenso en los niveles plasmáticos de glucosa.

Al contrario de lo que sucedía en el hipotiroidismo, en el hipertiroidismo todos los procesos metabólicos aparecen activados, aunque por lo general, no se presenta una activación paralela del anabolismo y catabolismo, predominando generalmente este último. Como resultado, la concentración estacionaria de ciertos metabolitos difiere grandemente de la que presentan los animales eutiroideos. Así, la glucosa plasmática se encuentra elevada en el hipertiroidismo (Lamberg, 1965) y todo el cuadro metabólico se asemeja bastante al de los animales diabéticos (Freinkel y Metzger, 1971).

La actividad de los enzimas gluconeogénicos está aumentada en el hipertiroidismo (Menahan y Wieland, 1969) y aunque se ha descrito que no siempre se presenta

dicho aumento (Murad y Freedland, 1967), parece bien establecido que la gluconeogénesis de animales con elevados niveles de hormonas tiroideas está aumentada con relación a la de los eutiroides. (Levine, 1965; Freedland y Krebs, 1967; Menahan y Wieland, 1969). También se presenta en el hipertiroidismo un aumento en la utilización de glucosa (Rabinowitz y Myerson, 1967), lo cual concuerda con una mayor actividad de enzimas glicolíticos (Winnick, 1970) y del shunt de las pentosas monofosfato (Dow y Allen, 1961), en estos animales. El metabolismo hidrocarbonado está también aumentado en el hipertiroidismo como consecuencia de una mayor absorción intestinal de glucosa (Brown y Barker, 1966).

Al contrario de lo que ocurría con la glucosa plasmática, el glucógeno hepático es bajo en el hipertiroidismo (Kuriyama, 1918; Coggeshall y Greene, 1933) lo que ha de ser debido al aumento de glucogenolisis que aparece en estas condiciones como consecuencia de la activación de la fosfarilasa hepática (Hornbrook y Col., 1965). Por otra parte, el ciclo de Cori se encuentra incrementado en la tirotoxicosis (Svedmyr, 1966).

El metabolismo de las grasas se encuentra también alterado en el hipertiroidismo. En esta situación hay una aumentada utilización de lípidos que se refleja tanto en una gran movilización de los depósitos grasos (Vaughan, 1967; Fisher y Ball, 1967; Bray y Goodman, 1968)

como en una elevada oxidación de los ácidos grasos (Bressler y Wittels, 1966). Los datos relacionados con el efecto del hipertiroidismo sobre la lipogénesis son, sin embargo, bastante confusos, ya que hay autores que encuentran disminuida la síntesis de ácidos grasos (Myant y Iliffe, 1963), mientras que otros llegan a resultados opuestos.

Resulta difícil decidir si los cambios metabólicos que aparecen en el hipo e hipertiroidismo son debidos directamente a los efectos de las hormonas tiroideas o si están mediados por alteraciones que aparecen en otras glándulas endocrinas.

La hipófisis es una de las glándulas más afectadas cuando hay un defecto o exceso de hormonas tiroideas. En el hipotiroidismo hay una aumentada secreción de tirotropina, lo que se traduce en unos altos niveles plasmáticos de dicha hormona (Morreale y Col., 1970). Lo contrario ocurre con la hormona de crecimiento que se encuentra muy disminuida en estas condiciones (Griesbach y Purves, 1945; Daughaday y Col., 1968) produciéndose como consecuencia una disminución y parada del crecimiento en los animales tiroidectomizados. En el hipotiroidismo existe también una disminución de la esteroidogénesis (Hellman y Col., 1959), posiblemente como consecuencia de un funcionamiento hipofisario menos activo.

Otra glándula intensamente afectada por una bajada en los niveles circulantes de hormonas tiroideas es el páncreas endocrino. La tiroidectomía produce una disminución de la salida "in vitro" de insulina pancreática (Malaisse y Col, 1967) y se han encontrado niveles muy bajos de insulina plas

mática, tanto tras la tiroidectomía, como tras el tratamiento con antiroideos (Jolin y Col., 1970).

También en el hipertiroidismo existen alteraciones hipofisarias, especialmente en la biosíntesis y secreción de TSH, lo que se traduce en unos bajos niveles plasmáticos de esta hormona (Montoya, 1972). Al contrario de lo que ocurría en el hipotiroidismo, en el hipertiroidismo aparece un aumento de la esteroidogénesis, posiblemente como consecuencia de una aumentada liberación de hormona corticotropa por la hipófisis (Hellman y Col., 1959). El tratamiento con altas dosis de T_4 produce una disminución en el contenido pancreático y secreción de la insulina (Malaisse y Col., 1967); se ha descrito también una acelerada degradación de la insulina en el hipertiroidismo (Cohen, 1957; Elgee y Williams, 1955), pero existe todavía una gran confusión en la literatura respecto a la relación del hipertiroidismo con el funcionamiento pancreático. Así, por ejemplo, la insulina plasmática se encuentra elevada o normal según algunos autores (Yalow y Berson, 1960; Hales y Hyams, 1964), mientras que se encuentra disminuida según otros (Orsetti y Col., 1967).

4) PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO DE LAS INTERRELACIONES DE HIDRATOS DE CARBONO Y GRASAS EN RATAS HIPOTIROIDEAS E HIPERTIROIDEAS.

Como vemos en estas dos situaciones, el hipo e hipertiroidismo, el metabolismo hidrocarbonado y lipídico es-

tá muy alterado y pueden servir como modelos experimentales para el estudio de la regulación del mismo. Esto nos ha llevado a estudiar el efecto de la tiroidectomía y la administración de distintas dosis de tiroxina exógena sobre diversos parámetros del metabolismo intermediario. Al igual que en el caso de las ratas lactantes, no nos ha interesado conocer la concentración o actividad de un enzima aislado, sino más bién el determinar cómo este enzima, unido a otros muchos enzimas, metabolitos, etc. está funcionando "in vivo". Como el centro de muchas alteraciones metabólicas es el hígado nos ha interesado especialmente el estudio de este órgano. Los parámetros determinados han sido similares a los estudiados en el caso de los animales lactantes, dedicando especial atención a los metabolitos reguladores.

También en este modelo experimental hemos utilizado animales alimentados "ad libitum" y sometidos al ayuno, en este caso de 48 horas.

Como hemos visto que tanto el hiper como el hipotiroidismo vienen generalmente acompañados de cambios en otras glándulas distintas del tiroides, nos ha interesado determinar si en nuestras situaciones experimentales las alteraciones metabólicas se deben a una acción directa de las hormonas tiroideas o podrían haber sido desencadenadas por cambios en otras hormonas. Para ello hemos determinado la hormona de crecimiento hipofisaria y la tirotropina e insulina plasmáticas, como índices de la actividad hipofisaria y pancreática de estos animales.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S



I- ANIMALES

Hemos utilizado ratas blancas de la cepa Wistar del criadero de nuestro laboratorio.

II- CONDICIONES AMBIENTALES

Debido a la influencia que tienen las variaciones ambientales en el metabolismo intermediario, los animales han permanecido en una habitación de temperatura continuamente regulada entre 20 y 22°C. Asimismo estuvieron sometidos a doce horas de luz y doce de oscuridad al día.

III- SITUACIONES EXPERIMENTALES

En el presente trabajo hemos utilizado dos modelos experimentales bien diferenciados:

A: Ratas lactantes

B: Ratas hipo e hipertiroideas

A-RATAS LACTANTES

Como madres hemos utilizado ratas normales, jóvenes, de peso comprendido entre 150-200g. que eran primíparas y se han cruzado con machos asimismo normales. Unos días antes del parto las hembras preñadas las separamos en jaulas individuales,

A lo largo de todo el embarazo y hasta el final de los experimentos, han tenido libre acceso al agua y a la comida y no han sufrido tratamiento de ningún tipo.

Utilizamos las crías de ambos sexos, a distintas edades: 5, 10, 20 y 30 días. Hemos procurado elegir camadas

de un tamaño aproximado descartando las de un número pequeño de individuos (por debajo de siete), al fin de evitar grandes diferencias en la cantidad de leche ingerida por los animales de distintas camadas.

El estudio lo hemos hecho en ratas alimentadas y tras un ayuno de 24 horas. En este último caso, los animales eran separados de sus madres, teniendo únicamente agua a su disposición.

Como controles utilizamos ratas adultas, vírgenes, de un peso aproximado al de las madres y recibiendo el mismo tipo de alimento que éstas. Lo mismo que en el caso de los animales lactantes, unas tuvieron acceso a la comida "ad libitum" y otras fueron sacrificadas tras un ayuno de 24 horas, durante el cual sólo pudieron beber agua.

B-RATAS HIPO E HIPERTIROIDEAS

En esta situación experimental tenemos cinco subgrupos diferentes:

- a- Ratas controles sin tiroidectomizar (C)
- b- Ratas tiroidectomizadas sin dosis sustitutiva de tiroxina (T+0)
- c- Ratas tiroidectomizadas e inyectadas diariamente, por vía intraperitoneal, con $0.1 \mu\text{g}$ de tiroxina/100 gramos de peso corporal (T+0.1)
- d- Ratas tiroidectomizadas inyectadas con $2 \mu\text{g}$ de tiroxina (T+2)
- e- Ratas tiroidectomizadas inyectadas con $25 \mu\text{g}$ de tiroxina (T+25)

En todos estos animales, excepto en los controles, se practicó una tiroidectomía quirúrgica (Zarrow y Col., 1964), cuando pesaban 40-50g. La operación se realizó bajo anestesia con éter y el tiroides se arrancó con pinzas, una vez puesto al descubierto por corte en la piel y separación de los músculos prelaríngeos. La piel se suturó con tres puntos.

Con el fin de eliminar los posibles restos de tiroides que hubieran podido quedar, dos días después de la operación las ratas fueron inyectadas con 50 μ Ci de I^{131} .

Dos días después de la administración del iodo radiactivo se comenzaron las inyecciones de tiroxina. Con el fin de saber la cantidad exacta de solución de tiroxina correspondiente a cada animal, éstos fueron pesados todos los días.

Con el fin de que todos los animales estuvieran sometidos a las mismas condiciones experimentales, los dos primeros grupos: C y T+0, fueron inyectados diariamente con 1ml de solución salina.

La tiroidectomía y el mantenimiento de los animales la realizamos en colaboración con el Dr. E. Montoya.

Preparación de las soluciones de tiroxina:

Hemos empleado la sal disódica de la L-tiroxina (Sigma). La T_4 se disuelve en agua destilada con una lenteja de sosa y se lleva al volumen deseado con una solución al 2% de plasma de rata y salino (0.8%). De esta forma preparamos una solución que contiene aproximadamente 100 μ g de T_4 /ml (lo cual se comprueba valorando el iodo químico) y a

partir de aquí obtenemos las soluciones de trabajo diluyendo siempre con salino/plasma. Hemos procurado que el volumen a inyectar fuera de unos 0.25ml/100g de peso. Las soluciones de trabajo se reparten en fracciones de unos 3ml y se guardan congeladas de forma que no se descongelan hasta el día de la inyección.

IV- DIETAS

Todos los animales utilizados en el estudio de las ratas lactantes estuvieron alimentadas con el pienso habitual en nuestro laboratorio (piensos Condor), administrado en forma de gránulos, cuya composición es:

Hidratos de carbono.....	49.5%
Proteínas.....	21.4%
Grasas.....	3.0%
Sales minerales y vitaminas	

Lógicamente, durante la lactancia, las ratas más jóvenes aquí utilizadas se alimentaban a expensas de la leche materna, cuya composición calórica aproximada (Dymsza y Col., 1964) es:

Hidratos de carbono.....	8%
Proteínas.....	23%
Grasas.....	69%

Hemos de hacer notar que hacia los trece días de edad las ratas empiezan a mezclar la leche con la dieta sólida que toma la madre y hacia los treinta días su alimentación es prácticamente como la de un adulto. Nosotros hemos

comprobado este punto abriendo los estómagos de los animales y observando que, mientras que los estómagos de los animales de 5 y 10 días sólo contenían leche, los de los de 20 días contenían la mezcla de leche y dieta sólida y en los estómagos de los animales de 30 días prácticamente nunca encontramos leche.

Los animales del segundo grupo experimental, es decir las ratas hipo e hipertiroideas, estuvieron sometidas hasta su sacrificio a una dieta de bajo contenido en iodo de tipo Remington (Remington, 1937; Remington y Levine, 1936). Esta dieta contiene 0.05-0.09 μg de iodo/gramo de dieta y su composición es:

Harina de maíz.....	6kg
Gluten de trigo.....	2.5kg
Levadura de cerveza.....	1kg
ClNa.....	150g
CO ₃ Ca.....	150g

Estos componentes se mezclan y se guardan en forma de polvo seco. Todos los días se mezcla la cantidad necesaria de polvo con suficiente agua desionizada y se administra a los animales en forma de masa.

Los animales controles recibieron el mismo tipo de dieta, pero suplementada con 1.7 μg de IK/g de polvo seco.

V- SACRIFICIO

En todos los casos el sacrificio se hizo por decapitación y entre las 10 y 12.30 de la mañana, con el fin de

evitar las interferencias que podrían provocar la existencia de ritmos circadianos en algunos de los parámetros estudiados.

VI- TOMA DE MUESTRAS

1-Sangre

Una vez sacrificados los animales, se recoge la sangre del cuello en recipientes conteniendo heparina seca. Se toman alícuotas de 0.2ml (o de 0.1ml en las ratas más pequeñas), colocándolas en un tubo que contiene 1.4ml (o 0.7 ml en el segundo caso) de agua destilada. Esta sangre se utiliza para la desproteinización y posterior valoración de glucosa y cuerpos cetónicos. En el caso del grupo III-B, el resto de la sangre se traslada a tubos de centrifuga para la obtención del plasma en que se valora la insulina, el iodo ligado a proteínas (PBI) y el TSH.

2-Hígado

Inmediatamente después de que se ha abierto el abdomen del animal, se extrae un trozo de hígado que se congela en un vaso de precipitado que contiene nitrógeno líquido. Toda esta operación se realiza en menos de 20 segundos y se descartan aquellos animales en que se ha invertido más tiempo, ya que en ellos podría haber degradación de ciertos metabolitos inestables (Acetil-CoA, ac. pirúvico, etc.).

Con el peso de las distintas porciones congeladas y sin congelar calculamos el peso total del hígado.

En el caso de las ratas lactantes un trozo del hí

gado sin congelar, lo colocamos en un vasito tarado conteniendo solución salina para la posterior determinación de la celularidad hepática. Asimismo, en algunos casos, hemos tomado un trozo para hacer cortes histológicos y finalmente en otras ocasiones, hemos utilizado una porción de hígado para la valoración de su contenido de agua.

En el caso de los animales más pequeños (de 5 y 10 días), hemos tenido que utilizar dos ratas para conseguir la cantidad de sangre e hígado necesaria para nuestras valoraciones.

3-Hipófisis

Una vez extraída la hipófisis, fue pesada e introducida en un tubo que contenía 0.7ml de sacarosa al 40%, guardándose congelada para la determinación posterior de hormona de crecimiento.

VII- VALORACIONES EN SANGRE

1-Desproteínización

Hemos utilizado el método de Somogyi (Somogyi, 1945), cuyo fundamento es la precipitación de las proteínas sanguíneas mediante la formación de SO_4Ba , a partir de SO_4Zn y $(\text{OH})_2\text{Ba}$.

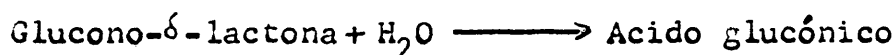
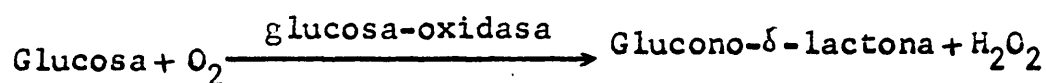
Como hemos dicho anteriormente (sección VI-1), se pipetearon 0.2ml de sangre en 1.4ml de AD. A esta mezcla se le añadieron 0.2ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, 4.6% y 0.2ml de SO_4Zn , 4.6%. Ambas soluciones han de ser equivalentes, lo cual se comprobaba anteriormente con fenoftaleína como indicador.

Se agitó y se centrifugó en frío a 3000 r.p.m x 20

min. El sobrenadante se guardó en congelador hasta el momento de la valoración de la glucosa y cuerpos cetónicos.

2-Valoración de glucosa

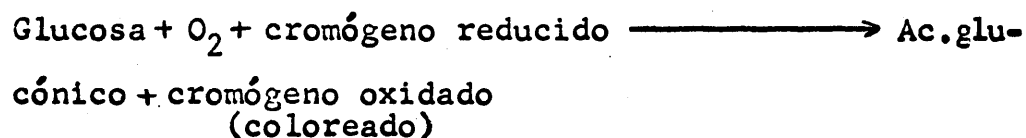
Hemos utilizado el método de la glucosa-oxidasa (Nugget y Nixon, 1957), cuyo fundamento es: la glucosa oxidasa, en presencia de oxígeno, oxida la glucosa hasta ácido glucónico por las siguientes reacciones:



El acoplamiento de estas reacciones con un sistema de peroxidasa-cromógeno oxidable, nos facilita un método colorimétrico para la determinación de glucosa. La reacción es como sigue:



Así pues, en la suma de las tres reacciones tenemos:



Por consiguiente, con cantidad suficiente de cromógeno reducido, glucosa oxidasa, peroxidasa y oxígeno, el color amarillo que aparece depende de la cantidad de glucosa existente en la muestra.

A partir de una solución madre de glucosa (10mg de glucosa en 100ml de ácido benzoico 0.1%), se hicieron las

diluciones oportunas con el fin de conseguir las concentraciones: 6.25, 12.5, 25 y 50 μ g de glucosa/0.1ml, que son los puntos que hemos utilizado para construir la curva patrón.

Como reactivo hemos empleado el "Glucostat" (Worthington, USA), el cual consiste en los enzimas liofilizados (glucosa oxidasa y peroxidasa) y el cromógeno reducido, que se disuelven en 100ml con AD en el momento de la valoración.

Procedimiento:

Se utilizaron alícuotas de 0.1ml del plasma desproteinizado y la misma cantidad de los patrones antes citados. A todas se añadió 0.1ml de tampón fosfato 0.2M, pH7.4 y 1ml del Glucostat ya diluido. Se incubaron en un baño de agua a 37° durante 1 hora. Al cabo de este tiempo, la reacción se detuvo con dos gotas de ClH 2N y la densidad óptica se leyó en espectrofotómetro a 415 m μ de longitud de onda.

3-Valoración de cuerpos cetónicos

Utilizamos el método de Bessman y Anderson (Bessman y Anderson, 1957). Este método requiere la conversión del acetatoacetato y β -hidroxibutirato a acetona, que es la sustancia que valoramos.

Por decarboxilación térmica, en medio ácido, el acetatoacetato forma acetona. A su vez, por acción de un oxidante fuerte (el dicromato), el β -OH-butirato forma acetoacetato, que a su vez se decarboxila térmicamente produciendo acetona.

La acetona formada reacciona con el salicilaldehído, en medio básico, formando un compuesto coloreado: la di-

hidroxibenzol-acetona. Como la intensidad de color de este compuesto depende de la cantidad de acetona que estaba presente, disponemos así de un método colorimétrico de valoración.

Procedimiento:

A partir de una solución de acetona bisulfito (10 umoles/me), se hicieron las diluciones necesarias con AD para preparar la curva patrón; los puntos utilizados han sido: 0.3, 0.2, 0.1 y 0.05 umoles/ml. Estos puntos se hacen por triplicado, junto con un "0" que contiene únicamente AD.

Empleamos sangre desproteinizada (sección Vii-1) (0.25ml de sobrenadante en el caso de las ratas ayunadas y 0.5ml en el caso de las alimentadas); llevada a un volumen final de 1ml con agua destilada, que es el volumen en que tenemos los puntos de la curva patrón.

Muestras y patrones se digirieron durante 10min. a 110°C en baño de arena con 0.25ml de SO_4H_2 13.6N, en tubos bien cerrados.

Después de la digestión los tubos se dejaron enfriar y cuando estaban bien fríos se destaparon y se pipeteó en su interior, con la mayor rapidez posible, 0.25ml de dicromato potásico 0.4%. Esta operación se hace con velocidad para evitar la pérdida de acetona.

Nuevamente se digirieron a 110°C, esta vez durante 30min. Una vez sacados del baño y fríos, se añadieron rápidamente 0.05ml de salicilaldehído/metanol (1:1) y 1ml de KOH saturada.

Al cabo de media hora de desarrollo de color, la reacción se detuvo con 0.5ml de etanol 50%.

Una vez centrifugados los tubos, la DO del sobrenadante se leyó en un colorímetro (Coleman) a 500 m μ de longitud de onda.

4-Valoración de insulina

Utilizamos un radioinmunoensayo de doble anticuerpo (Hales y Randle, 1963). Este método está basado en la competencia de la insulina de la muestra que quiere valorarse con insulina radiactiva, por reacción con un anticuerpo específico antiinsulina. La cantidad de insulina radiactiva ligada al anticuerpo, varía inversamente a la concentración de insulina fría presente en la muestra.

En este método de doble anticuerpo, el complejo insulina-antiinsulina se hace insoluble mediante un segundo anticuerpo. El precipitado se separa de la insulina libre por filtración y se mide la radiactividad. La concentración de insulina de una muestra dada es referida a una curva patrón preparada con insulina purificada.

Los anticuerpos utilizados han sido fabricados por "The Welcome Research Laboratories", en colaboración con "The Radiochemical Center", Amersham.

La gammaglobulina antiinsulina es de cobaya tratado con insulina porcina cristalizada y la antigammaglobulina antiinsulina es de conejo.

Para disolver los distintos reactivos se utilizaron los siguientes tampones:

Tampón A: tampón fosfato monosódico (40 mM) que contiene albúmina bovina (0.5%). El pH se ajusta a 7.4 con sosa.

Tampón B: ClNa 0.9% en buffer A.

Tampón C: solución de albúmina al 4% en tampón A.

Los anticuerpos, previamente titulados por la compañía fabricante, se presentan mezclados con EDTA, debiéndose disolver en tampón B en el momento en que se van a utilizar.

La insulina iodada (marcada con I^{125}), procede también del "Radiochemical Center". Está preparada a partir de insulina bovina cristalina y especialmente purificada. Su potencia es de 24.3 unidades internacionales/mg. Se presenta en un vial que contiene 5ml. Para evitar sucesivas descongelaciones se dividió en 5 porciones de 1 ml. El día del ensayo una de estas porciones es diluida con 7.2ml de tampón A.

Como patrón de insulina hemos utilizado insulina de rata (Novo, Dinamarca). Se preparó una solución de 200 μ U/ml que se congeló en fracciones de 1ml. El día del ensayo una de estas fracciones se diluyó con tampón B, con la finalidad de obtener los puntos 10, 20, 50 y 100 μ U/ml, con los que construimos nuestra curva patrón.

Procedimiento:

Se pipetearon 100 μ l del plasma problema o de uno de los patrones, 100 μ l de tampón B y 100 μ l de la solución que contiene los anticuerpos diluidos.

Después de agitados, los tubos se guardaron en nevera durante seis horas. Durante este tiempo se lleva a cabo

la formación del complejo de los anticuerpos con la insulina fría. Entonces se añadieron a todos los tubos 100 μ l de la solución que contiene la insulina-I¹²⁵ y una vez agitados, se dejaron de nuevo reposar en nevera durante 18 horas.

El contenido de cada tubo se filtró al vacío sobre una membrana de acetato de celulosa Oxoid, grado 0.45 y se añadió 1ml de tampón C para evitar que posibles restos de insulina-I¹²⁵ que no han reaccionado con el anticuerpo, se queden pegados al filtro. Una vez secos los filtros, que contienen el precipitado insulina-anticuerpo-antigammaglobulina, se depositaron en tubos y la radiactividad fue contada en un contador Packard de centelleo sólido.

5-Valoración del PBI (iodo ligado a las proteínas plasmáticas)

Hemos utilizado el método de Benotti (Benotti y Benotti, 1963), que es una modificación del de Zack (Zack y Col., 1952).

Como paso previo a la valoración química del iodo, hay que precipitar las proteínas plasmáticas. Para ello alícuotas de 1 ml de plasma se precipitaron con 10 ml de TCA 5% y después de reposar durante 15 minutos, se centrifugaron a 2000 r.p.m x 10 min.

El sobrenadante, que contiene el iodo no ligado a las proteínas, se descartó y el precipitado se lavó de nuevo poniendo otros 10 ml de TCA; se volvió a centrifugar y a decantar el sobrenadante, y el precipitado se usó para la determinación del iodo.

El método se basa en la digestión de las muestras durante el tiempo necesario para destruir toda la materia orgánica y convertir los compuestos iodados en forma inorgánica, en presencia de un ácido muy fuerte: el ácido clórico. Durante esta digestión el iodo pasa a iodato. Este iodato pasa a ioduro por la adición de arsenito y se valora midiendo el poder que tiene de catalizar la decoloración de la mezcla de cérico y arsenito, en presencia de ClNa . La decoloración se debe al paso de la forma oxidada del cerio (amarillo), a ceroso (incoloro).

Los plasmas problema se analizaron al tiempo que una serie de soluciones patrones de IO_3K . Para ello, hicimos las diluciones necesarias con AD, a partir de una solución madre que contenía $10 \mu\text{g}$ de I/ml , obteniendo los puntos siguientes: 0.02 , 0.04 y $0.06 \mu\text{g}$ de I/ml , con los que construimos nuestra curva patrón.

Procedimiento:

Tanto a los patrones como a los precipitados de los plasmas tratados con tricloroacético, se les añadieron 3 ml de ac.clórico, conteniendo cromato sódico en la concentración de $1 \text{ mg} / 3 \text{ ml}$ de ácido. El ácido clórico se preparó haciendo reaccionar clorato potásico y ácido perclórico, conservando la mezcla reaccionante durante 12 horas a -23°C , al cabo de las cuales se filtró, obteniéndose una concentración aproximada de ácido clórico del 28% .

Todas las muestras y patrones se digirieron en baño de arena a $105-110^\circ\text{C}$. La digestión se detuvo inmediatamente

te después de la aparición de unos cristallitos de óxido de cromo. Las muestras digeridas se pasaron a temperatura ambiente, considerándolas en condiciones para hacer con ellas la reacción.

A los digeridos se les añadió 2 ml de AD y 1 ml de arsenito (esta solución de arsenito se preparó con 10 mg de anhídrido arsenioso, 50 g de ClNa y 400 ml de SO_4H_2 5N, hasta 2 litros con AD).

Los tubos se introdujeron en un baño de agua a 30° y se les añadió 0.5 ml de sulfato cérico-amónico (22 g de SO_4Ce en 1 l de SO_4H_2 2.5N). A los 30 min. de esta adición, se leyeron las muestras a 420 m μ en un colorímetro Coleman.

VIII-VALORACIONES EN HIGADO

Como hemos dicho anteriormente (sección VI-2), se tomaron distintas alícuotas de hígado para las diversas valoraciones efectuadas. El proceso al que han sido sometidas estas distintas porciones puede esquematizarse de la siguiente forma:

A- PROCESOS EN HIGADO NO CONGELADO:

- a-Determinación de la celularidad
- b-Cortes histológicos
- c-Determinación del agua

B- PROCESOS EN HIGADO CONGELADO:

- a-Extracto de hígado en ácido perclórico para la posterior valoración de Ac-CoA, ácido cítrico, ácido pirúvico y ácido láctico.

b-Digestión en KOH para la valoración de glucógeno

c-Extracto en cloroformo-metanol para la purificación y posterior valoración de lípidos y otros derivados: ácidos grasos totales, ácidos grasos libres, fosfolípidos, DNA y proteínas.

A- PROCESOS EN HIGADO NO CONGELADO

a-Determinación de la celularidad hepática

Hemos hecho el conteo de núcleos celulares siguiendo la técnica de Weber (Weber y Cantero, 1957), en la cual el número de núcleos celulares, para un peso conocido de hígado, es contado microscópicamente después de homogenizar el tejido y teñir los núcleos.

El medio de homogenización es salino y el colorante utilizado es la orceína (0.325% en ácido acético glacial al 45%). Cuando esta solución de orceína va a ser utilizada, se filtra dos veces por papel Whatman nº1, con el fin de eliminar el precipitado del colorante.

Procedimiento:

El conteo de los núcleos fue realizado por la Sta. Mercedes Goñi de Blázquez.

Se pesaron de 300 a 500 mg de hígado, tomando porciones de distintas partes del hígado. Se homogenizó con 5 ml de salino frío (en homogenizador de vidrio con vástago de teflón), durante 1 min. y en frío.

El homogenado se transfirió a un tubo graduado y se llevó a un volumen final de 10 ml con salino. Una vez bien

mezclado, 0.25 ml del homogenado se pasaron a un segundo tubo graduado en el que se añadió la solución de orceína hasta un volumen de 10 ml. Se mezcló bien, con ayuda de unas bolitas de vidrio, con el fin de que todos los núcleos se tiñeran y al cabo de 1 ó 2 horas se llevó a cabo el conteo. Este se realizó colocando una alícuota de la solución en una cámara cuentaglóbulos. El conteo se hizo en el microscopio con los métodos normales para contar células sanguíneas. Con el fin de evitar errores se hizo por cuadruplicado y se utilizó la media para realizar los cálculos correspondientes.

b-Cortes histológicos

Se hicieron cortes de hígado fresco en secciones de 4m μ , que fueron teñidos con eosina y hematoxilina. De distintos campos de estas preparaciones se hicieron diapositivas que se utilizaron para contar la proporción de células mono y binucleadas que existía en nuestros animales experimentales.

c-Determinación del agua

Se depositó un trozo de hígado fresco de unos 100-300 mg en un pequeño vasito de vidrio tarado previamente. Las muestras se colocaron en una estufa a 110°C y se pesaron en días sucesivos hasta que el peso fue constante dos días seguidos. En este momento se consideró que se había evaporado todo el agua y con la diferencia de peso entre el hígado fresco y el hígado seco calculamos la cantidad de agua que había presente en el tejido.

B- PROCESOS EN HIGADO CONGELADO

a- EXTRACTO DE HIGADO EN ACIDO PERCLORICO

Una parte del hígado congelado en nitrógeno líquido se trituro en un mortero de porcelana frío, con nitrógeno líquido, teniendo cuidado de que éste no se acabase mientras duró la pulverización. Con una espátula (también fría), se transfirió una alícuota a un vaso tarado que contenía ClO_4H al 6% (aproximadamente en una proporción de 3 ml /g de hígado). El vaso con el hígado se pesó con el fin de conocer la cantidad exacta de hígado que habíamos tomado.

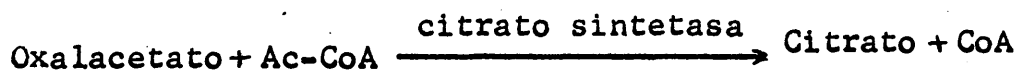
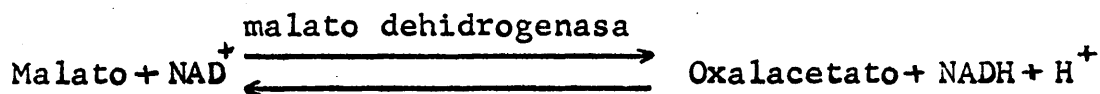
El polvo de hígado fue agitado en el perclórico con una varilla y la mezcla fue vertida en un homogenizador de vidrio esmerilado donde se homogenizó en frío. El homogenizado se centrifugó a 6000 r.p.m x 40 min. en una centrífuga Sorvall a 4°C y una alícuota del sobrenadante, de volumen conocido, se pasó a un tubo graduado y se neutralizó en frío por adición gota a gota de bicarbonato potásico saturado, para precipitar los iones ClO_4^- en forma de ClO_4K .

Después de reposar en hielo durante 15 minutos, se centrifugó a 2000 r.p.m x 10 min. a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, guardándose en hielo para las valoraciones de Ac-CoA, ac.pirúvico y ac.cítrico, que se realizaron en el mismo día. El resto del sobrenadante se guardó congelado para la posterior valoración de ac.láctico.

a-1 Valoración de Ac-CoA

Hemos empleado el método de Herrera y Freinkel (1967). Es un método fluorimétrico, en el que detectamos el cambio de fluorescencia producido por la reducción de NAD^+ a

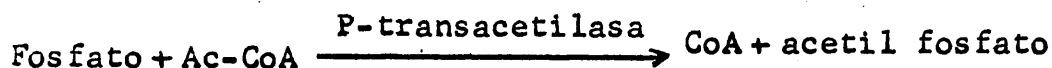
NADH. Está basado en el acoplamiento de estas dos reacciones:



Cuando en presencia de ambas enzimas, malato y NAD^+ , añadimos nuestra muestra problema que contiene Ac-CoA, éste reacciona con el OAA para formar citrato y CoA. Por tanto hay una disminución de oxalacetato y como consecuencia la primera reacción, que es reversible, se desplaza hacia la derecha, siendo cuantitativo el cambio de fluorescencia producido por el paso de NAD^+ a NADH.

En la valoración de cada muestra problema se utiliza una "standard interna" de AcCoA, que ha sido previamente preparada y valorada como indicamos a continuación:

Preparamos una solución que contiene unos 100 $\mu\text{moles/ml}$ que se reparte en tubitos y se guarda congelada. El día del ensayo se descongeló una de estas fracciones y se valoró su contenido exacto en Ac-CoA por medio del enzima fosfo-transacetilasa. Este enzima cataliza la transferencia de grupos acilo entre el fosfato y el Ac-CoA:



El Ac-CoA tiene su máxima absorbancia a 232 $\text{m}\mu$ y esto no sucede con el CoA, por lo que al llevarse a cabo la reacción se produce un descenso en la DO, que será proporcional a la cantidad de Ac-CoA presente.

Esta reacción puede llevarse a cabo con arsénico en vez de fósforo y en este caso existe la ventaja de que la

reacción es completamente irreversible, por lo que nosotros hemos utilizado este procedimiento. Para esta reacción se pipeteó, por triplicado, en una cubeta de espectrofotómetro:

1 ml de la solución de Ac-CoA

25 μ l de ClK 2M

25 μ l de Na_2HAsO_4

Se leyó la densidad óptica de la mezcla a 232 m μ . Se añadieron 5 μ l de fosfo-transacetilasa (Boehringer, 1mg / ml) y se volvió a leer otra vez la DO, hasta que a los tres minutos aproximadamente se ha completado la reacción y la DO no desciende más. Las DO se leyeron frente a una cubeta en la que en lugar de haber Ac-CoA había 1 ml de AD.

Con las diferencias de densidades ópticas (antes y después de la adición del enzima) y conociendo el coeficiente de extinción del Ac-CoA (4.4×10^{-6} a 232 m μ de longitud de onda), podemos calcular la cantidad exacta de m μ moles que contiene nuestra solución de Ac-CoA.

Procedimiento de valoración de Ac-CoA en el tejido:

Se utilizó un fotómetro-fluorímetro Eppendorf al que va adosado un termostato, que regula la temperatura entre 30 y 34°C y un registro en el que quedan señalados los cambios de fluorescencia.

Se mezclaron en una cubeta:

2 ml de AD

0.5 ml de NAD/malato (0.2 μ moles de malato y 0.2 μ moles de NAD en 0.5 ml de Tris 1M pH8)

10 μ l de malato dehidrogenasa (Boehringer 10 mg /ml

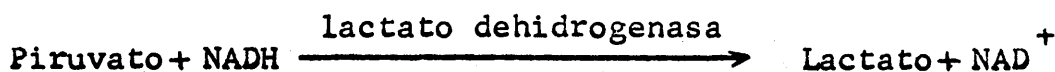
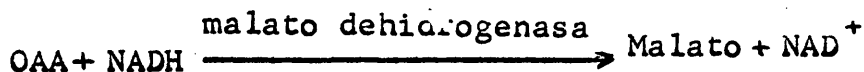
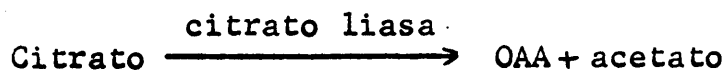
0.5 ml del extracto de hígado en ac.perclórico.

Una vez la cubeta en el fluorímetro, se esperó a su estabilización y en ese momento se añadieron 5 μ l de citrato sintetasa (Boehringer 5mg /ml), mezclando con la misma micropipeta. Se esperó a que la fluorescencia aumentase hasta llegar a un "plateau" y una vez acabada esta reacción, se añadieron 25 μ l de la "standard interna" de Ac-CoA valorada previamente, se esperó hasta alcanzar un nuevo "plateau" y se volvieron a añadir otros 25 μ l de Ac-CoA.

Comparando el cambio de fluorescencia debido a la adición de la "standard" conocida, con el producido por nuestra muestra problema, podemos calcular la cantidad de Ac-CoA presente en esta última.

a-2 Valoración de ácido pirúvico y ácido cítrico

Hemos utilizado un método enzimático (Moellering y Gruber, 1966), que está basado en las siguientes reacciones:



Lo primero que valoramos es el ácido pirúvico por medio de la LDH: el NADH pasa a NAD^+ , lo que se traduce en una disminución de la DO (a 366 m μ), que será proporcional a la cantidad de pirúvico presente.

Una vez terminada esta reacción valoramos el áci-

do cítrico añadiendo CL, la cual en presencia de cantidades suficientes de MDH y NADH, produce el paso $\text{NADH} \longrightarrow \text{NAD}$ que, como en el caso anterior, estará relacionado con la cantidad de cítrico presente.

Procedimiento:

En una cubeta de espectrofotómetro Eppendorf mezclamos:

0.75 ml de buffer de trietanolamina 0.1M pH7.6

5 μ l de Cl_2Zn 0.03M

5 μ l de MDH (Boehringer 10 mg /ml)

25 μ l de NADH 0.01M

Se mezcló y se leyó la DO: E_1 a 366 m μ contra un blanco de AD.

Se añadieron 10 μ l de LDH, se mezcló y se esperó a que la DO llegara al "plateau": E_2 .

Se añadieron 10 μ l de CL y se esperó a un nuevo "plateau", que se consigue a los 6 ó 7 minutos y se anotó esta última DO: E_3 .

La diferencia E_1-E_2 representa el cambio de DO debida al ácido pirúvico y la diferencia E_2-E_3 la debida al ácido cítrico.

Las concentraciones de ambos metabolitos se calcularon de la siguiente forma:

$$\mu\text{moles de ac.pirúvico/ml de muestra} = \frac{(E_1 - E_2) \times V}{K \times 10^{-6} \times d \times v}$$

$$\mu\text{moles de ac.cítrico/ml de muestra} = \frac{(E_2 - E_3) \times V}{K \times 10^{-6} \times d \times v}$$

Donde:

V=volumen contenido en la cubeta

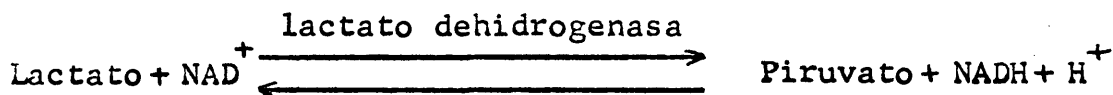
K=coeficiente de extinción del NADH(3.3×10^{-6} a 366 m μ)

d=paso de luz de la cubeta (usamos cubetas de 1mm de paso de luz)

v=volumen de la muestra.

a-3 Valoración de ácido láctico

Hemos utilizado el método de Hohorst (1965), basado en la siguiente reacción:



Como esta reacción está desplazada hacia la izquierda, hay que eliminar el piruvato que se está formando a partir del láctico que estamos valorando, lo cual se consigue en presencia de hidrazina con lo que se forma piruvato hidrazona. Para ayudar a la captura de los protones liberados, la reacción se hace en un medio muy básico.

Procedimiento:

Se mezclaron en una cubeta de espectrofotómetro:

1.25 ml de tampón hidrazina-glicina-EDTA pH9.5 (0.4M hidrazina, 1M glicina, 0.2% EDTA)

25 μ l NAD^+ 0.05M

100 μ l del extracto de hígado en ac.perclórico

Se leyó la DO a 366 m μ y se añadieron 10 μ l de LDH..La densidad óptica aumenta lentamente a medida que se forma NADH, hasta que al final la reacción llega a un "plateau". El proceso suele durar al menos media hora. La canti-

dad de ácido láctico en la muestra se calcula lo mismo que en el caso de los ácidos pirúvico y cítrico, en función de las diferencias del cambio de DO, utilizando la misma fórmula.

b- PROCESO DEL HIGADO EN KOH: VALORACION DEL GLUCOGENO

Alícuotas de hígado congelado (50-200 mg) se digirieron en KOH al 30%, en baño maría a 100° durante 30-45 min. Estos digeridos se utilizaron para la purificación del glucógeno hepático por el método de Good y Col. (1933).

El glucógeno después de la digestión se purifica mediante precipitación con alcohol. A continuación se hidroliza en medio ácido y se valora la glucosa producida (nosotros utilizamos el método de la glucosa oxidasa).

Procedimiento:

Al digerido de hígado en potasa se añadieron 2.5 ml de etanol absoluto y para favorecer la precipitación del glucógeno se guardó durante un día en congelador a - 24°. Pasado este tiempo, se centrifugó en frío a 3000 r.p.m. x 10 min. y se descartó el sobrenadante. El precipitado de glucógeno se resuspendió en 1 ml de AD y se añadieron otros 2.5 ml de alcohol. Se guardó al menos otra noche en congelador y se volvió a centrifugar y descartar el sobrenadante. Se añadió 1 ml de SO_4H_2 5N y se hidrolizó el glucógeno durante 2 hr. a 100° al baño maría.

El hidrolizado se neutralizó con NaOH en presencia de fenoftaleína alcohólica como indicador y se llevó a

un volumen final de 10 ml.

Cuando los animales estaban alimentados se diluyó el neutralizado 1:10 y de aquí se tomaron 0.1 ml para la valoración de la glucosa. Cuando los animales estaban ayunados se utilizaron 0.2 ml para la valoración de glucosa (secc. VII-2) del neutralizado sin diluir.

Los datos de glucosa obtenidos se multiplicaron por 0.9 para corregir la pérdida de agua de la molécula de glucógeno.

c - PROCESO DEL HIGADO EN CLOROFORMO-METANOL

A partir de otra alícuota de hígado congelado se extraen y purifican los lípidos por el método de Folch y Col. (1957).

El tejido (50-150 mg), se homogenizó en cloroformo-metanol (2:1) y se centrifugó a 3000r.p.m. x 10 min. El sobrenadante se pasó a un tubo graduado y el precipitado se lavó dos veces con fracciones de 3 ml de cloroformo-metanol. La mezcla de sobrenadantes se llevó a 10 ml con cloroformo-metanol.

Posteriormente se purificaron los lípidos separándolos de otras sustancias también solubles en cloroformo-metanol. Para ello se añadieron 2 ml de AD, se agitó y centrifugó, apareciendo dos fases: la superior formada por una mezcla de metanol y agua que contiene sustancias hidrosolubles como sales minerales, aminoácidos etc. y la inferior formada por cloroformo, que no es soluble en agua, y que

contiene todos los lípidos. Se eliminó la fase superior y se volvió a añadir metanol hasta 10 ml para restablecer las proporciones. Se repitió dos veces más el lavado, pero estas veces se utilizaron 2 ml de salino (0.9%) en vez de AD para restaurar la fuerza iónica. Después de eliminar la última fase superior, el extracto se llevó finalmente a 10 ml con metanol. Este es el extracto purificado de lípidos a partir del cual valoramos ácidos grasos libres, ácidos grasos saponificables y fosfolípidos.

El precipitado de hígado que quedó en las primeras centrifugaciones lo utilizamos para la valoración de proteínas y DNA. Para ello se llevó a sequedad en baño de agua de 40°, bajo corriente de nitrógeno y se digirió durante 18 hr a 37° en 2.5 ml de NaOH 1N; del digerido tomamos 2 ml para la valoración de DNA y 25 µl por duplicado para la valoración de proteínas, como veremos posteriormente.

c-1 Valoración de ácidos grasos libres y ácidos grasos totales por el método de Ho y Meng

Como paso previo a la valoración de ácidos grasos totales, se llevó a cabo la saponificación para hacer que los ácidos grasos que estaban esterificados pasasen a ácidos grasos libres, que es lo que valoramos en el método.

Saponificación:

2.5 ml de extracto purificado de los lípidos (extracto de Folch) se llevaron a sequedad a 40° bajo corriente de nitrógeno. Una vez secos los tubos conteniendo

los lípidos, se pipetearon 2 ml de KOH 1N en etanol al 95% y la saponificación se llevó a cabo en baño de agua a 100°C durante 2 hr. Durante la saponificación, según se iba evaporando el solvente utilizado, se añadió alcohol 95% con el fin de lograr que los tubos no quedasen nunca secos.

Una vez acabada la saponificación, se acidificó con 2 ml de H_2SO_4 1.5N para transformar las sales potásicas de los ácidos grasos en ácidos grasos libres. Los ácidos grasos se extrajeron en 5 ml. de heptano por agitación y posterior centrifugación. De la fase de heptano conteniendo los lípidos, se tomaron 0.25 ml para la valoración de los ácidos grasos.

Valoración:

El método (Ho y Meng, 1969) se basa en la capacidad del cobalto para formar un complejo con los ácidos grasos.

Este método utiliza cobalto radiactivo en forma de $^{60}\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, aprovechando la gran penetración de este isótopo así como su larga vida media.

La gran ventaja de este método reside en que, a diferencia de lo que sucede en otros, los fosfolípidos no interfieren en el ensayo, y en su gran sensibilidad, ya que puede valorarse de 0.1 a 200 nanomoles.

El complejo cobalto-ácido graso es insoluble en heptano solo, pero soluble en una mezcla de cloroformo/heptano, por lo que en las condiciones de este ensayo el complejo aparece en la fase orgánica, de la cual puede tomarse una alícuota para contar la radiactividad.

Para el buen funcionamiento de este método la actividad específica del Co ha de ser alta, la radiactividad total baja y la cantidad molar de nitrato de cobalto tan baja como 2.5 por la cantidad de ácidos grasos esperada.

A partir de una solución de ácido palmítico de 2 μ moles/ml en heptano se hicieron las diluciones necesarias a fin de conseguir las concentraciones para construir una curva patrón; los puntos utilizados fueron 1, 5, 10, 25, 50, 100 y 200 nmoles/0.25 ml. Contra esta curva patrón fueron leídas las muestras problema.

Procedimiento:

Se preparó una solución de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ (2mM de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ y 0.8 ml de acético glacial, se llevan a 100 ml con SO_4Na_2 saturado), que se mezcló con trietanolamina y solución saturada de SO_4K_2 en las proporciones 250 μ l, 25 μ l y 225 μ l, respectivamente. A esta mezcla se añadió el isótopo: 5 μ l de $^{60}\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ (5 μ Ci).

Se pipetearon en un tubo con tapón 50 μ l de esta mezcla de reacción, 500 μ l de cloroformo-heptano (4:1) y 250 μ l de los patrones o de las muestras. Para la valoración de ácidos grasos libres se utilizaron 250 μ l del extracto purificado de lípidos y para la de los ácidos grasos totales de la fase de heptano en que están presentes los lípidos tras la saponificación.

Una vez bien mezclado se centrifugó a 2000 r.p.m. x 20 min a fin de ayudar a la buena separación de las fases,

se tomó una alícuota de 0.5 ml de la fase orgánica y se contó la radiactividad en un contador Packard.

c-2 Valoración de los ácidos grasos totales por el Método de Duncombe

Como habíamos indicado anteriormente, los ácidos grasos esterificados se transformaron en ácidos grasos libres por medio de la saponificación (c-1) y seguidamente se procedió a su valoración por el método de Duncombe (1963). Este método está basado en la capacidad de los ácidos grasos libres de formar una sal de cobre al hacerlos reaccionar con el nitrato de cobre. La sal de cobre, al reaccionar con el dietilditiotiocarbamato forma un complejo coloreado (amarillo) soluble en cloroformo. La intensidad de color es función de la concentración inicial de los ácidos grasos que han reaccionado con el cobre, lo que utilizamos para su determinación cuantitativa. Este método es sensible y lineal para valores de 0.025-0.3 μ moles de ácidos grasos libres.

A partir de una solución madre de ácido palmítico (1 μ mol/ml.), en cloroformo, se hicieron las diluciones necesarias con dicho solvente para conseguir las concentraciones 0.025, 0.075, 0.1, 0.2 y 0.3 μ moles/ml. Contra esta curva patrón fueron leídas las muestras problema.

Procedimiento:

La saponificación se llevó a cabo, como hemos descrito anteriormente (sección VIII - B, c-2) a partir de 5 ml del extracto purificado de los lípidos (extracto de

Folch). Todo el heptano con el que se extrajeron los ácidos grasos fue llevado a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Los ácidos grasos fueron resuspendidos en 5 ml de cloroformo, de los cuales utilizamos 0.1 ml para la valoración.

En el mismo día del ensayo se preparó el "reactivo de cobre", que consta de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 6.45%, ácido acético 1M y trietonalomina 1M en la proporción 20/2/18 ml.

A las muestras y a los patrones, suspendidas en la misma cantidad de cloroformo (3 ml), se les añadió 3 ml del reactivo de cobre. Cada tubo se agitó 3 veces durante 30 sg. Los tubos fueron centrifugados, después de la agitación, a 1000 r.p.m. x 10 min. La fase superior fue descartada y de la de cloroformo (la inferior) se tomaron 2 ml que se pasaron a un nuevo tubo donde se hicieron reaccionar con 0.5 ml de una solución de dietilditioicarbamato (0.1% en sec. butanol redestilado). El color aparece inmediatamente y la DO fue leída a 440 m μ en un espectrofotómetro Beckman DU.

c-3 Valoración del fósforo de fosfolípidos

Hemos utilizado el método de Fiske y Subbarow, 1925). El fósforo de los fosfolípidos presentes en el extracto de Folch, se convierte en fósforo inorgánico mediante la digestión con un ácido fuerte (ácido perclórico). En medio ácido, el fósforo inorgánico reacciona con el molibdato amónico formando fosfomolibdato. Este compuesto, en presencia de un agente reductor, se convierte en molibdeno que tiene color azul y es determinado colorimétricamente.

Como agente reductor utilizamos el ácido 1-2-4 amino-naftol-sulfónico de la casa Technicon Chemical Co (fórmula AR-24-58), que contiene: 150 g de bisulfito sódico, 5 g de sulfito sódico anhidro y 2.5 g de ANSA.

Para la elaboración de la curva patrón utilizamos PO_4H_3 . Partimos de una solución madre que contiene 1 mg° de fósforo inorgánico/ml, a partir de la cual tomamos 5, 12,5, 25, 50 y 100 μg , que son los puntos utilizados para construir la curva patrón.

Procedimiento:

Una alícuota de 2 ml del extracto purificado de los lípidos fue llevada a sequedad a 40° bajo corriente de nitrógeno. A los tubos conteniendo el extracto de lípidos seco, se les pipeteó 1 ml de ClO_4H 72% y se digirieron en baño de arena a 250° durante el tiempo necesario para conseguir la decoloración de las muestras. Junto con éstas se digirieron también los patrones, al fin de igualar al máximo las condiciones del ensayo.

Una vez acabada la digestión se añadieron unos 5 ml de AD y 0.5 ml de molibdato amónico al 0.5%. Los tubos se agitaron y se añadió entonces 1 ml de ANSA. Se llevaron a un volumen final de 10 ml, se mezclaron nuevamente y se esperó 30 min. para el desarrollo del color. Al cabo de este tiempo se leyó la DO a 660 $\text{m}\mu$ en un colorímetro tipo Coleman.

c-4 Valoración de Proteínas

Hemos utilizado el método de Lowry (Lowry y Col. 1951). El fundamento de esta técnica es el siguiente: al hacer reaccionar una solución de proteínas con un reactivo alcalino de cobre se forma un complejo cobre-proteína. Este complejo se coloca en presencia del reactivo Folin-Ciocalteu (ácido fosfotungsténico y fosfomolibdato). El fosfomolibdato se reduce a molibdeno por el complejo cobre-proteína para dar un color azul, cuando el medio es básico.

Como patrón utilizamos albúmina bovina (Sigma), Se prepara una solución de 10 mg /ml de albúmina en AD y a partir de aquí hacemos las diluciones necesarias con AD para conseguir las concentraciones 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μ g de proteína/ml. Con estos puntos elaboramos la curva patrón frente a la cual leemos las muestras.

Procedimiento:

Como hemos dicho anteriormente (secc. VI, B-c), las proteínas del hígado las valoramos a partir del precipitado que resulta de la homogenización y posterior centrifugación de la alícuota de hígado que estaba en cloroformo-metanol.

El precipitado se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se digirió con 2.5 ml de NaOH 1N a 37° durante 18 hr. Del digerido se tomaron 25 μ l, por duplicado, para la valoración. Se añadió 1 ml de AD a cada muestra y

a los patrones 25 μ l de NaOH 1N, con el fin de igualar las condiciones. En muestras y patrones se pipetearon 5 ml de la solución alcalina de cobre que consta de 50 ml de CO_3Na_2 al 2% en AD y 1 ml de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en tartrato sódico-potásico al 1%. Una vez mezclados, se añadieron 0.5 ml del reactivo de Folin diluido 1:1 con AD. Se esperó media hora para el desarrollo del color y se leyó la DO a 500 y 700 m μ .

c-5 Valoración del fósforo del DNA

Para la precipitación y purificación del DNA utilizamos el método de Schmitd y Tannhauser (1945).

En el precipitado del hígado procedente de la alícuota homogenizada en cloroformo-metanol están presentes tres tipos de compuestos que contienen fósforo: el DNA, el RNA y las fosfoproteínas. Tras la digestión en sosa, de la forma descrita (secc. VI, B-c), los dos últimos compuestos se solubilizan por hidrólisis parcial mientras que el DNA queda intacto. Posteriormente, el DNA se aísla por precipitación en ácido perclórico. Si este precipitado se hidroliza en medio muy ácido, el fósforo que se liberará procederá exclusivamente del DNA. Este fósforo se valora como hemos visto anteriormente (c-3), por el método de Fiske y Subbarow.

Procedimiento:

Del digerido en NaOH 1N tomamos una alícuota de 2 ml precipitándose el DNA con 5 ml de ClO_4H 20%. Se dejó sentar 10 min., se centrifugó a 3000 r.p.m. x 10 min. y se

descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 5 ml de ClO_4H 10% y se volvió a repetir la misma operación.

Este último precipitado se digirió en baño de arena a 250°C en 1 ml de ClO_4H 72%. El fósforo liberado se valoró exactamente igual que en el caso de los fosfolípidos y la curva patrón utilizada fue también la misma.

IX - GLUCONEOGENESIS Y FORMACION DE LIPIDOS "IN VIVO" A PARTIR DE PIRUVATO

Estos experimentos fueron realizados únicamente en el caso de los animales lactantes y ratas adultas controles (secc. III, A).

Con el fin de estudiar la formación "in vivo" de glucosa en sangre y glucógeno y lípidos en hígado, los animales fueron inyectados con piruvato radiactivo y decapitados a distintos tiempos, como veremos más adelante.

El piruvato radiactivo, en forma de piruvato sódico-3- C^{14} , proviene de la casa Amhersan (Inglaterra) y se presenta en viales de $50\text{ }\mu\text{Ci}$. Su actividad específica es de 21 mCi/mmol .

Este piruvato se disolvió en AD el mismo día del experimento; si sobró parte, se guardó en congelador a -24° y se utilizó lo antes posible, con el fin de evitar que el pirúvico se degradase debido a su gran inestabilidad.

Los animales experimentales de todos los grupos (secc. III, A), fueron divididos en dos subgrupos:

T - Los que fueron inyectados con piruvato radiactivo en concentración traza.

S - Los que recibieron piruvato radiactivo + piruvato frío, es decir, piruvato en cantidad sustrato con el fin de eliminar las diferencias que pueden existir en el "pool" endógeno de dicho metabolito.

Los animales de ambos subgrupos fueron sacrificados a los 10 y 30 min. después de la inyección.

1 - INYECCIONES

a - Animales de 5 días

5 días_T: Recibieron $1 \mu\text{Ci}$ de piruvato-3- C^{14} en un volumen de 0.1 ml. Para ello $50 \mu\text{Ci}$ de piruvato-3- C^{14} fueron disueltos en 1 ml de AD. De aquí se tomaron 0.02 ml (es decir $1 \mu\text{Ci}$), que fueron completados hasta 0.1 ml con 0.08 ml de solución salina isotónica 0.9%.

5 días_S: Recibieron $1 \mu\text{Ci}$ de piruvato-3- C^{14} y 0.03 mmoles de piruvato frío, sal sódica (Sigma) en un volumen de 0.1 ml. Para ello se tomaron 0.02 ml del piruvato radiactivo disuelto en 1 ml de AD y se completaron hasta 0.1 ml con 0.08 ml de una solución de piruvato frío conteniendo 330 mg en 8 ml de AD.

Las ratas fueron inyectadas subcutáneamente en el dorso con una micro-jeringa Hamilton de 0.1 ml. La aguja se hizo penetrar desde la zona cervical a la caudal, a fin de evitar que el líquido saliese por el orificio dejado por la aguja.

b - Animales de 10 días

10_días T: Recibieron 1.5 μCi de piruvato-3- C^{14} en un volumen de 0.1 ml. Para ello se disolvieron 50 μCi de piruvato-3- C^{14} en 0.67 ml de AD. De aquí se tomaron 0.02 ml (1.5 μCi), que fueron completados hasta 0.1 ml con 0.08 ml de salino.

10_días S: Recibieron 1.5 μCi de piruvato-3- C^{14} y 0.045 mmoles de piruvato sódico frío en un volumen de 0.1 ml. Para ello se tomaron 0.02 ml del piruvato radiactivo y se llevó a 0.1 ml con 0.08 ml de piruvato sódico (495 mg, en 8 ml de AD). La inyección se llevó a cabo como en el caso de los animales de 5 días.

c - Animales de 20 días

20_días T: Recibieron 3 μCi de piruvato-3- C^{14} en un volumen de 0.3 ml. 50 μCi del piruvato radiactivo se diluyeron en 1 ml de AD. de aquí se tomaron 0.06 ml (3 μCi) que fueron llevados hasta 0.3 ml con 0.24 ml de salino.

20_días S: Recibieron 3 μCi de piruvato-3- C^{14} y 0.09 mmoles de piruvato frío en un volumen de 0.3 ml.

Se tomaron 0.06 ml del piruvato radiactivo (3 μCi) y se completó hasta 0.3 ml con 0.24 ml de piruvato sódico frío (330 mg en 8 ml de AD).

Como los animales son ya lo suficientemente grandes, fueron inyectados intraperitonealmente con una jeringa de tuberculina de 1 ml.

d - Animales de 30 días

Fueron inyectados con las mismas cantidades y de la misma forma que los animales de 20 días.

e - Animales adultos

Adultos T: Recibieron 5 μ Ci de piruvato-3-C¹⁴ en un volumen de 0.5 ml. Se diluyeron 50 μ Ci de piruvato-3-C¹⁴ en 1 ml de AD, de aquí se tomaron 0.1 ml (5 μ Ci), que se llevaron a 0.5 ml con 0.4 ml de solución salina.

Adultos S: Recibieron 5 μ Ci del piruvato-3-C¹⁴ y 0.5 mmoles de piruvato frío en un volumen de 0.5 ml.

Se tomaron 0.1 ml del piruvato radiactivo y se completó hasta 0.5 ml con 0.4 ml de una solución de piruvato sódico (687.5 mg en 5 ml de AD).

Las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con una jeringa de tuberculina de 1 ml.

2 - TOMA DE MUESTRAS

Los animales fueron sacrificados por decapitación y la sangre se recogió del cuello en recipientes conteniendo heparina seca. De ahí se pipetearon 10 μ l en un vial de radiactividad (o de contaje), al que se le añadieron 0.5 ml de AD.

Otra alícuota de 0.1 ml se pipeteó en un tubo de pico, enfriado en hielo, que contenía 0.7 ml de AD para la posterior desproteinización. En el caso de los animales de 30 días y las controles adultas se pipetearon 0.2 ml de sangre en un tubo que contenía 1.4 ml de AD.

Inmediatamente después de sangrado el animal, se abrió el abdomen y una porción de hígado se congeló en un vaso que contenía nitrógeno líquido no transcurriendo nunca más de 20 sg.

Una alícuota del hígado congelado se pesó y se introdujo en un vialillo que contenía 0.9 ml de KOH 30%.

Otra alícuota se introdujo, una vez pesada, en un vialillo que contenía aproximadamente 2 ml de cloroforno-metanol 2:1.

3 - INCORPORACION DE RADIATIVIDAD A LA SANGRE TOTAL

A los viales de radiactividad conteniendo 10 μ l de sangre diluida con AD, se les añadieron 10 ml de líquido de centelleo de muestras solubles en agua (ver composición más adelante. Secc. IX - 8) y fueron contados en un contador Nuclear Chicago de centelleo, de radiaciones β .

Con el fin de corregir el "quenching" debido a la coloración de la sangre, la radiactividad de cada vial se contó dos veces, una normalmente, y otra con una "standard" externa de bario que posee el contador. La radiactividad de la muestra se corrigió por la "inhibición" en la standard de bario.

Los resultados fueron expresados en el % de la radiactividad administrada en 100 μ l de sangre.

Con el fin de conocer exactamente la radiactividad administrada a cada animal, hemos preparado siempre mayor cantidad de la solución que inyectamos. Una alícuota de 50 μ l



de esta solución la diluimos 200 veces con AD. De aquí se pipetearon 25 μ l por triplicado, se añadió AD hasta 0.5 ml y 10 ml de líquido de centelleo para muestras solubles en agua. Estos patrones fueron contados junto con las muestras de sangre y en iguales condiciones que éstas.

4 - FORMACION DE GLUCOSA- C^{14} EN PLASMA

Con el fin de diferenciar la radiactividad que aparece en el plasma en forma de glucosa- C^{14} de la que aparece en forma de otros compuestos marcados (pirúvico que no ha sido utilizado, ácido láctico, etc.), el plasma fue pasado a través de microcolumnas de resinas cambiadoras de iones, que retienen estos metabolitos y dejan pasar la glucosa que no está cargada (Herrera, Knopp y Freinkel, 1969).

Las resinas utilizadas han sido Duolita A-4 (Diamond Alkali Company) y Dowex 1 x 2-400 (J.T. Boker Chemical Co.).

El Dowex se presenta en forma H^+ y es utilizado para retener los cationes. Se lava con ADD dos veces antes de ser utilizado.

La Duolita se activa como veremos seguidamente, con el fin de que quede en forma de OH^- y encargarse así de retener los aniones.

Activación de la Duolita

Unos 50 ml de resina se colocaron en una probeta y se lavaron 4 veces con 200 ml de ADD. Una vez eliminada el agua se lavó con NaOH 1.5N durante 10 min. Los restos de

sosa se eliminaron con 4 lavados con 200 ml de ADD. Se añadieron 200 ml de ClH 2N durante 10 min. Se eliminó el ClH y se volvió a pasar agua, como antes se había hecho con la sosa. Nuevamente se repitió toda la operación anteriormente descrita y por última vez se añadió NaOH 1.5N durante 10 min. Finalmente, se lavó repetidas veces con ADD hasta conseguir la neutralidad. De esta manera la Duolita quedó activada en forma OH^- .

Preparación de las microcolumnas

Como columnas se utilizaron jeringas de tuberculina de 1 ml. Estas jeringas tienen unos 10 cm de largo y 1 cm de diámetro. En el fondo de la columna se introdujo un poco de lana de vidrio para evitar que se escapasen las resinas por el orificio de la jeringa, mientras que el eluyente pasa libremente.

Hasta la marca de 0.3 ml la jeringa se llena con Duolita acompañada de ADD, con el fin de que la resina no quede seca nunca; hasta la marca de 0.7 ml se va empaquetando el Dowex y de ahí a la marca de 1 ml se pone nuevamente Duolita. En ningún momento la columna debe quedar seca.

En el caso de los animales de 5, 10 y 20 días se pasó por la columna una alícuota de 0.5 ml. de sobrenadante de plasma desproteínizado y se lavó con ADD hasta un volumen final de eluido de 2 ml. Para ello, el eluyente de la columna, desde el momento en que se aplicó la muestra, se recogió en un tubo graduado.

En los animales de 30 días y adultos se pasó 1 ml

del sobrenadante del plasma desproteinizado y, como en el caso anterior, el eluyente se llevó hasta 2 ml , lavando la columna con ADD.

De todos los eluidos se pipetearon 0.5 ml en un vial al que se añadieron 10 ml. de líquido de centelleo para muestras solubles en agua. La radiactividad se contó en un contador de centelleo Nuclear Chicago, junto con las standards correspondientes (secc. IX - 3).

Pruebas de recuperación

Con el fin de probar la eficiencia de las columnas se hicieron diversas pruebas. En primer lugar se pasaron diversas alícuotas de una cantidad conocida de glucosa-1-C¹⁴ y en todos los casos se recuperó en el eluido del 97 al 101% de la radiactividad aplicada. En segundo lugar se pasaron por la columna sustancias disociables, tales como alanina-U-C¹⁴, lactato-1-C¹⁴ y piruvato-3-C¹⁴. Estos tres compuestos quedaron retenidos por las resinas ya que nunca se recuperó más de un 0.1-0.3% de la radiactividad total.

Como podían haberse formado, a partir de la inyección de piruvato-3-C¹⁴, otros productos radiactivos que al circular por la sangre y no ser disociables (como por ej. el glicerol), podrían pasar por la columna igual que la glucosa, se determinó su posible contribución a la radiactividad de las columnas.

Para ello se incubaron los eluidos del plasma, de animales inyectados con pirúvico-C¹⁴, con hexokinasa y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa en presencia de ATP y TPN,

transformándose así la glucosa en 6-fosfo-gluconolactona y ácido 6-fosfo-glucónico, que deben quedar retenidos por la columna. Los incubados se pasaron por nuevas columnas y solamente se recuperó en el segundo eluido un 0.1% de la radiactividad presente en el primero. Estos resultados permiten afirmar que el único compuesto marcado y sin carga que aparece en el plasma en cantidad apreciable es la glucosa-C¹⁴ y, por tanto, la radiactividad total de los eluidos de las columnas es una expresión de la cantidad de glucosa formada.

Expresión de los resultados

El porcentaje de la radiactividad en forma de glucosa marcada se calculó en función del "espacio de glucosa". En el caso de los animales adultos, hemos considerado que este parámetro representa un 30% del peso corporal, basándonos en los datos Baker y Col. (1962). En los animales lactantes, hemos calculado el "espacio de glucosa" extrapolando los valores obtenidos por Vernon y Walker (1972 a) para animales de 2, 10 y 30 días de edad, de forma que hemos considerado que dicho parámetro en los animales de 5 días es del 60%, en los de 20 del 40% y en los de 10 y 30 días, los obtenidos por dichos autores (45 y 37% del peso corporal, respectivamente).

El cálculo del porcentaje de la radiactividad se realizó de la forma siguiente:

Por ciento de la radiactividad administrada en forma de glucosa-C¹⁴ =

$$= 100 \times \frac{\text{espacio de glucosa (ml)} \times \text{glucosa-C}^{14} \text{ en plasma (cpm/ml)}}{\text{radiactividad administrada (cpm)}}$$

Valoración de glucosa fría

Se utilizaron 0.1 ml de plasma desproteinizado para la estimación de glucosa por el método de la glucosa oxidasa, como ha sido descrito anteriormente (secc. VII - 2).

Actividad específica

Se expresa en cpm/mg. La actividad específica se ha calculado asumiendo que la radiactividad administrada era igual a 1×10^6 cpm en todos los casos.

5 - FORMACION DE GLUCOGENO-C¹⁴ EN HIGADO

La porción de hígado en KOH 30% se digirió en baño maría y el glucógeno se purificó como hemos indicado anteriormente (secc. VIII - B, b).

Los precipitados de glucógeno se hidrolizaron a 100°C con 0.5 ml (o 1 ml en los procedentes de ratas adultas) de SO₄H₂ 5N durante 2 hr. y se llevaron a un volumen de 2 ml con AD.

Se contó la radiactividad de una alícuota de 0.5 ml del hidrolizado ácido con 10 ml de líquido de centelleo para muestras solubles en agua. Como en algunas ocasiones los viales de radiactividad presentaban turbidez, fueron contados junto con la standard externa de bario para corregir el "quenching".

Expresión de los resultados

Por ciento de la radiactividad administrada en forma de glu

cógeno- C^{14} =

$$= 100 \times \frac{\text{peso del hígado(gr)} \times \text{glucosa-}C^{14} \text{ en hígado(cpm/gr)}}{\text{radiactividad administrada(cpm)}}$$

Valoración de glucógeno frío

1 ml del hidrolizado ácido del glucógeno purificado se neutralizó con sosa en presencia de fenoftaleína como indicador y se valoró la glucosa de esta solución por el método de la glucosa oxidasa (secc. VII - 2).

Actividad específica

Lo mismo que en el caso de la glucosa se expresó en cpm/mg y también aquí asumimos que la radiactividad administrada era igual a 1×10^6 cpm.

6 - GLUCONEOGENESIS TOTAL

Se calculó en función de la suma de los porcentajes de la radiactividad administrada convertida a glucosa y glucógeno.

7 - FORMACION DE LIPIDOS- C^{14} EN HIGADO

Los lípidos se extrajeron y purificaron a partir de la alícuota de hígado en cloroformo-metanol, por el método de Folch y Col. (1957), como hemos descrito anteriormente (secc. VIII - B, c).

4 ml del extracto de lípidos fueron llevados a sequedad a 40° bajo corriente de nitrógeno en viales de radiactividad. Se contaron con 5 ml de líquido de centelleo de lípidos (ver composición posteriormente, en la secc. IX - 8).

La radiactividad representa los lípidos totales- C^{14} formados.

Los resultados se expresaron como: % de la radiactividad administrada en forma de lípidos totales/100 mg de hígado.

Una alícuota de 5.5. ml del extracto de lípidos se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se saponificó con KOH en etanol, como hemos descrito anteriormente (secc. VIII - B, c-1). Una vez acidificado el saponificado, los ácidos grasos se extrajeron con heptano. La fase de heptano se pasó entera a un vial que fue llevado a sequedad a 40° bajo corriente de nitrógeno. La radiactividad se contó como en el caso de los lípidos totales con 5 ml de líquido de centelleo de lípidos y los resultados se expresaron de la misma forma.

La diferencia de ambos cálculos representa el glicerol de glicéridos formado a partir del piruvato radiactivo.

8 - COMPOSICION DE LOS LIQUIDOS DE CENTELLEO

Ya que las radiaciones emitidas por la desintegración del C^{14} no tienen energía para atravesar el vidrio del vial empleado para contar la radiactividad, hay que transformar esta energía en otra que por su longitud de onda sea capaz de atravesar el vidrio. Para esto utilizamos los líquidos de centelleo que constan de un solvente capaz de captar

la energía procedente de las desintegraciones del C^{14} y de un soluto que recoge la energía y la transforma en otra de tipo lumínico que sí atraviesa la pared del vial.

La composición de los líquidos de centelleo es distinta según el tipo de muestra utilizada; nosotros utilizamos líquidos de centelleo de dos tipos:

- Líquido de centelleo para muestras solubles en agua:

- 1 g de PPO(2-5 difenil-oxazol)
- 10 g de POPOP(2,2-p-fenil bis(5-fenil oxazol))
- 16 g de naftaleno

Se disuelven en 200 ml de xileno/dioxano/etanol 95%
(5/5/3)

- Líquido de centelleo para lípidos:

Se prepara primero una solución concentrada: 40 g de PPO u 0.5 g de POPOP, que se disuelven con tolueno hasta un volumen final de 1 l.

A partir de esta solución se prepara otra más diluida de la siguiente forma:

- 75 ml de la solución concentrada
- 90 ml de metanol
- 585 ml de tolueno libre de agua

Esta solución es el líquido de centelleo de lípidos que utilizamos, se debe guardar en botella oscura y atmósfera inerte, lo cual se consigue burbujeando con nitrógeno durante media hora.

X - VALORACIONES EN HIPOFISIS: DETERMINACION DE LA HORMONA DEL-CRECIMIENTO

La hipófisis que se guardó congelada en 0.7 ml de sacarosa al 40% (secc. VI - 3), se homogenizó en el momento de la valoración de la GH. Esta hormona se valoró por electroforesis en gel de poliacrilamida por la técnica de Escobar del Rey y Col.(1968). Las bandas de proteínas asociadas con la GH y la albúmina se identificaron basándonos en los hallazgos de Lewis y Col. (1965) y Jones y Col. (1965), para ratas.

Para la preparación de los geles se utilizaron las siguientes soluciones:

Solución A: Se mezclaron 48 ml de ClH 1N, 36.6 g de Tris y 0.46 ml de N,N,N',N'- Tetrametiletlenodiamina y se llevó hasta 100 ml con AD. pH 8.9.

Solución B: Se mezclaron 30 g de acrilamida, 0.8 g de N,N'- metilenobisacrilamida y 15 mg de ferricianuro potásico, que se llevaron con AD. hasta 100 ml.

Solución C: Persulfato amónico 0.14%

Procedimiento;

Se preparó una mezcla con 2 ml de solución A, 4 ml de solución B, 8 ml de solución C y 2 ml de AD. Se agitó ligeramente y con esta mezcla se llenaron cilindros de vidrio de unos 6 cm de altura, que se habían cerrado por uno de los extremos con papel parafinado. Se añadieron cuidadosamente unas gotas de agua para que el nivel superior del menisco quede plano y evitar la retracción de la superficie del

gel.

Se dejaron reposar durante unas horas para que se produjera la polimerización y una vez terminada ésta se eliminó el agua añadida a la superficie y el papel parafinado del otro extremo.

Los tubos se colocaron en el aparato de electroforesis de modo que quedasen perpendiculares, para evitar que las bandas aparezcan inclinadas. En el baño inferior del aparato se puso tampón Tris-glicina pH 8.3 (6 g de tris y 28.8 g de glicina, hasta un litro de AD.), diluido 1:10 y en el superior se añadieron unas gotas de una solución de azul de bromofenol 0.001% al tampón anterior.

Se pipetearon 0.2 ml del homogenado de hipófisis, con micropipeta; a través del tampón del recipiente superior, dejándolo resbalar cuidadosamente por las paredes del tubo y procurando no dañar la superficie del gel.

El aparato de electroforesis se conectó a la fuente de alimentación aplicando una intensidad de 4 mA por tubo. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron durante tres o cuatro minutos con una solución saturada de amido negro en metanol-agua-acético (5/5/1). Se lavaron con agua destilada y se pusieron a decolorar con la mezcla metanol-agua-acético, esta mezcla fija el colorante a las proteínas y lo elimina de las partes del gel en que éstas no existen. Cuando la mayoría del colorante ha sido lavado, los geles se colocaron durante varios días en ácido acético al 2% que termina la decoloración.

La densidad de las bandas fue medida en un microdensitómetro, determinándose el valor del área del pico correspondiente a la GH y a la albúmina. Los resultados se expresaron como la relación entre estas dos proteínas,

XI - CALCULOS ESTADISTICOS

Los datos de cada grupo experimental los presentamos como media \pm error standard. La expresión matemática del error standard es:

$$e.s = \sqrt{\frac{\text{varianza}}{n(n-1)}}$$

Donde:

varianza = $(\bar{x} - x)^2 = \sum x^2 - \bar{x} \sum x$, siendo \bar{x} la media de los datos y x el valor de cada dato.

n = número de datos del grupo experimental

A veces, en un grupo, aparecen uno o dos datos que se alejan mucho de valormedio. Para saber si estos datos deb~~e~~n despreciarse aplicamos el test del χ^2 . En unas tablas determinamos el valor del χ^2 en función del número de datos que parece que se salen del grupo y despreciamos los datos que sean mayores o menores que:

$$x \pm \sqrt{\chi^2 (d.s.)^2} = x \pm \sqrt{\chi^2 \frac{(\bar{x} - x)^2}{n-1}}, \text{ donde d.s. representa la desviación standard que viene dada por la fórmula: } d.s = \sqrt{\frac{\text{varianza}}{n-1}}$$

Si con el test de χ^2 se sale algún dato se vuelven a repetir los cálculos de la media y el e.s. despreciando esos datos.

El problema que se nos presenta siempre es el de decidir si la diferencia entre los datos medios de dos grupos experimentales distintos se deben simplemente a la variedad biológica o si la diferencia es estadísticamente significativa. Para ello, aplicamos el test "t" de "Student", según el cual siendo \bar{x} e \bar{y} la media de los dos grupos:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\text{e.s.d.}}$$

Cuando el número de datos individuales es distinto en ambos grupos experimentales el e.s.d. (error standard de la diferencia) tiene la siguiente expresión matemática:

$$\text{e.s.d.} = \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \frac{\sum (\bar{x}-x)^2 + \sum (\bar{y}-y)^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Cuando ambos grupos tienen el mismo número de datos ($n_1 = n_2$):

$$\text{e.s.d.} = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x}-x)^2 + \sum (\bar{y}-y)^2}{n(n-1)}}$$

En función de "t" y mediante las tablas de Student, calculamos la "p". La "p" nos indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias de los dos grupos se deba o no a la casualidad.

En los experimentos de tipo biológico se considera que cuando $p > 0.05$ la diferencia entre los dos grupos no es significativa y cuando $p \leq 0.05$ se considera que la diferencia es estadísticamente significativa (la probabilidad de que los dos grupos experimentales corresponda a poblaciones distintas es del 95% o mayor).

RESULTADOS

A- LACTANCIA Y METABOLISMO INTERMEDIARIO

Con el fin de estudiar las interrelaciones hidratos de carbono-grasas durante el período de la lactancia se utilizaron animales de 5, 10, 20 y 30 días, alimentadas y tras un ayuno de 24 hr. que se compararon con ratas hembras, vígenes, adultas (ver secc. III-A de Materiales y Métodos), consideradas como controles.

1- PESO DEL CUERPO Y DEL HIGADO

El peso del cuerpo va aumentando gradualmente durante el período de la lactancia. Como se puede observar en la fig. 2 la pendiente de la curva de peso es menor de los 10 a los 20 días que de los 5 a los 10 y aumenta mucho de los 20 a los 30 días de edad.

El peso del hígado aumenta también a lo largo de todo el período indicado (fig. 2) pero esto no ocurre de una manera completamente paralela al peso corporal, ya que el aumento de tamaño del hígado de los 5 a los 10 días es proporcionalmente menor que el del cuerpo durante ese mismo espacio de tiempo.

Tras el ayuno de 24 horas el peso del hígado disminuye en todos los grupos estudiados (fig.3). La máxima disminución porcentual se presenta en los animales de 5 días (37%), a los 10 y 20 días la disminución es algo menor (31%), mientras que en los animales mayores estudiados (30 días y adultos) esta disminución es considerablemente menor (14 y 19%).

Con el fin de observar estos fenómenos más claramente, hemos calculado la relación hígado/100 g de peso corporal (fig.3). Esta relación es significativamente más baja ($p < 0.05$) en los animales de 5 días que en los adultos y esto se acentúa aún más en los animales de 10 días en los que el valor hígado/100 g de peso es mínimo, siendo la diferencia con los controles aún más significativa ($p < 0.001$). Estos resultados confirman los descritos por otros autores (Vernon y Walker, 1968). En los animales de 20 y 30 días esta relación no difiere de la que presentan los controles.

Tras las 24 horas de ayuno la relación hígado/100 g de peso corporal disminuye en todos los grupos, como en el caso de los animales alimentados este parámetro es significativamente más bajo en los grupos de 5 y 10 días que en el grupo control e igual a éste en los de 20 y 30 días.

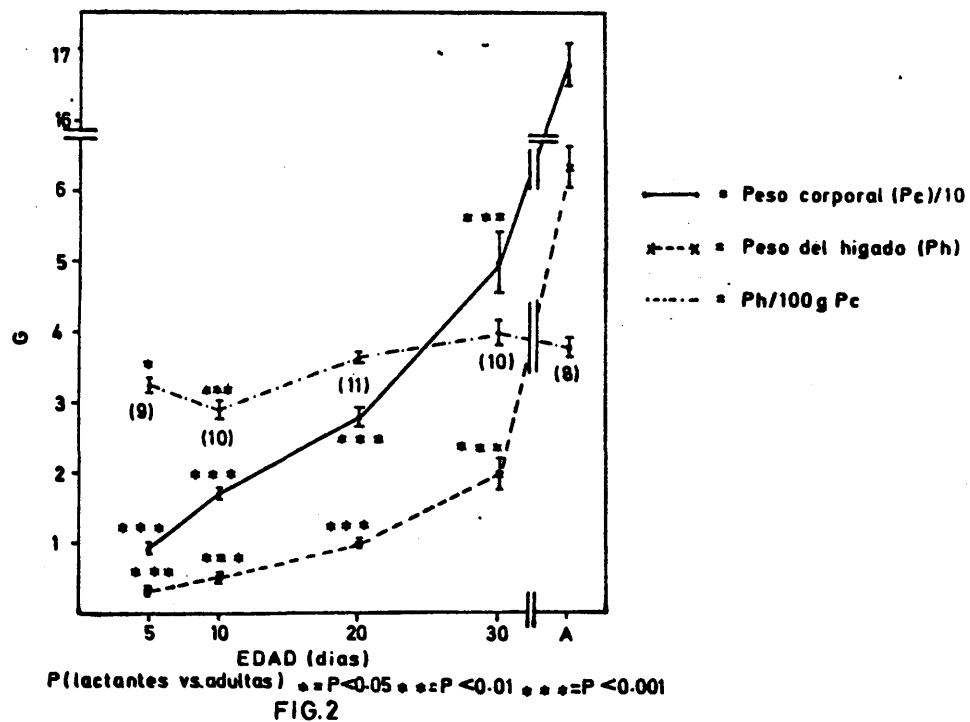
2- CELULARIDAD DEL HIGADO

Debido a los cambios en el peso del hígado, nos interesó estudiar la celularidad del mismo. Uno de los parámetros estudiados con el fin de conocer los cambios en la celularidad hepática a lo largo de la lactancia fue la contracción del fósforo de DNA.

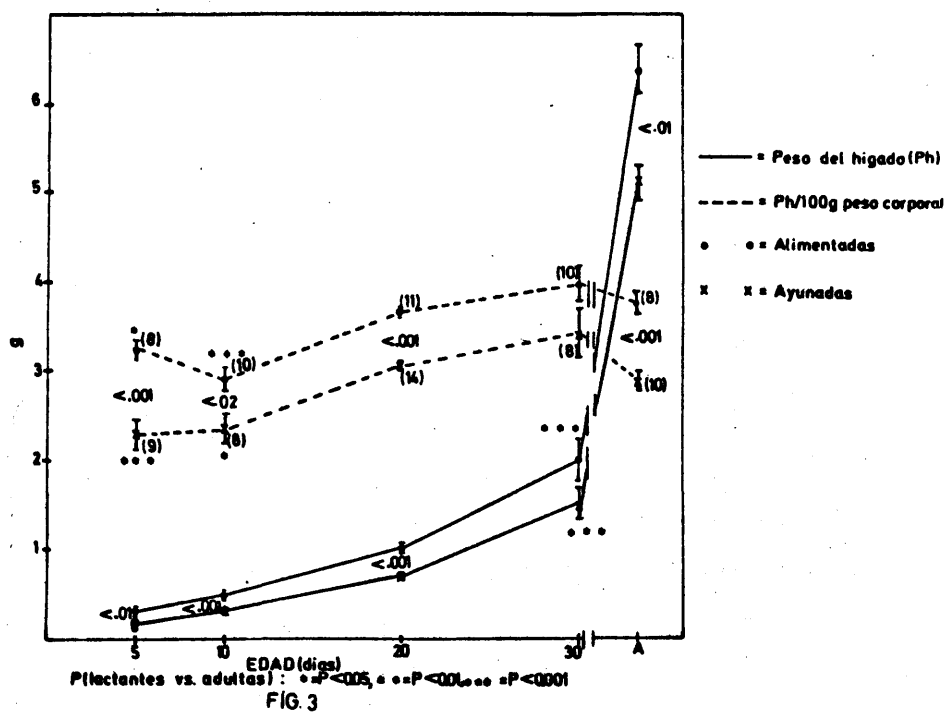
El P-DNA expresado por gramo de hígado es máximo en los animales más jóvenes (5 días) y va disminuyendo progresivamente con la edad hasta los 30 días, en que ya no hay diferencias con respecto a los controles (fig.4).

Cuando los animales se someten al ayuno este pará-

RELACION ENTRE LOS PESOS DEL CUERPO E HIGADO EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS ALIMENTADAS (Media±ESM)



EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA RELACION ENTRE LOS PESOS DEL CUERPO E HIGADO EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±ESM)



EFFECTO DE 24 HORAS EN AYUNO EN LA CONCENTRACION HEPATICA DE DNA-P
EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (MEDIA±E.S.M.)

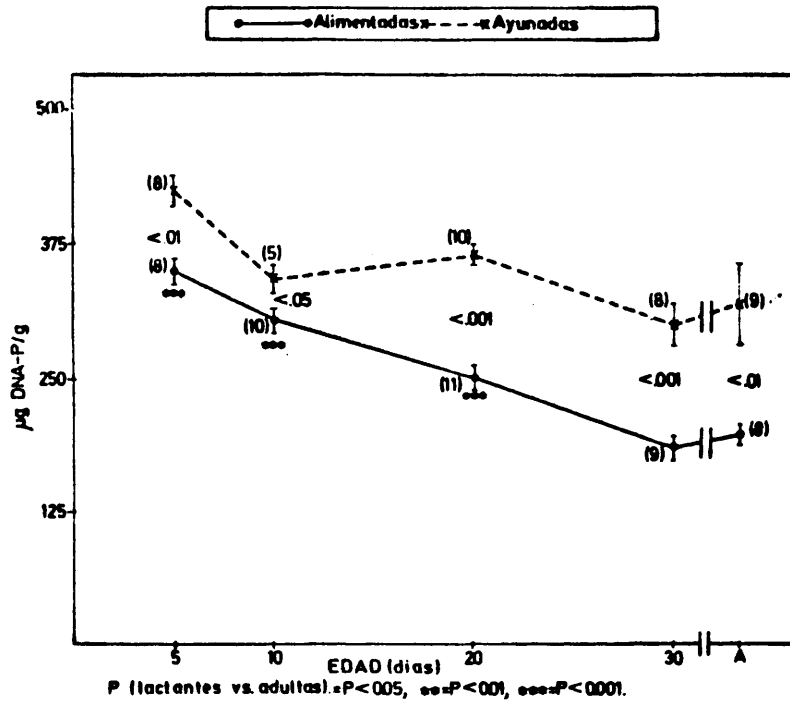


FIG 4

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION DE P DE DNA/HIGADO
EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±E.S.M.)

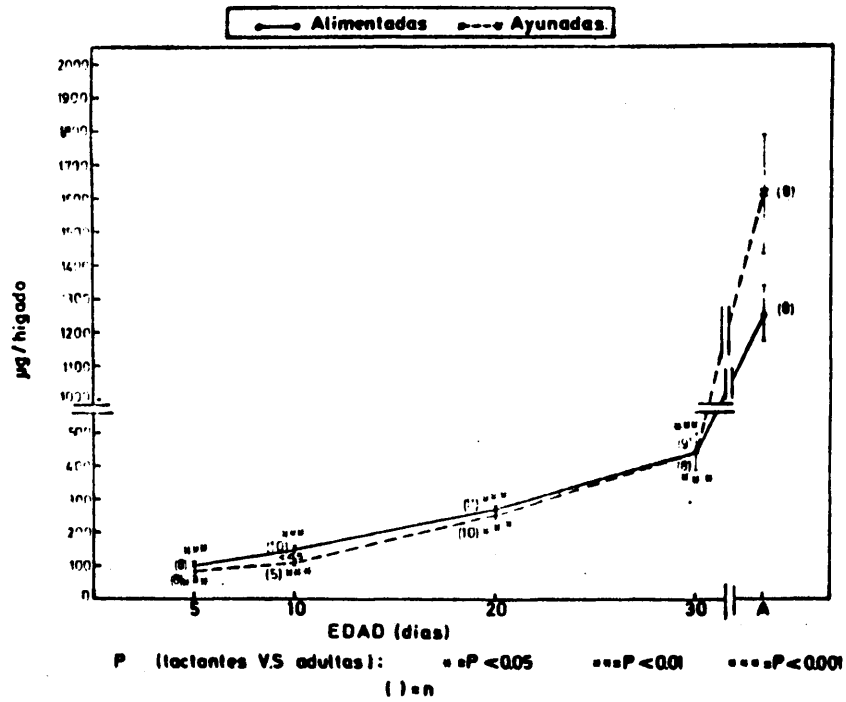


FIG 5

metro aumenta significativamente en todos los grupos estudiados, como se ha visto en otras ocasiones (Herrera y Freinkel, 1968; Herrera y Col., 1969)

Si el DNA se expresa en función del hígado total (fig.5), se puede observar que hay un aumento progresivo con la edad. Después de 24 horas de ayuno se mantiene en el mismo nivel que cuando estaban alimentadas en las ratas adultas y las de 5, 20 y 30 días, como en otras ocasiones (Herrera y Freinkel, 1968; Herrera y Col., 1969). Sin embargo, la concentración de DNA/hígado disminuye con el ayuno en las de 10 días.

En gran número de ocasiones se utiliza como único índice de celularidad la concentración de DNA. Sin embargo, debido a los drásticos cambios en la composición del hepatocito, que ocurren durante la lactancia, consideramos necesario el determinar el número de células, para obtener una evidencia directa de su celularidad. Como índice del número de células se contaron los núcleos del hígado. Como podía haber la posibilidad de que hubiera variaciones en la proporción de células mono y binucleadas en las distintas edades, se examinaron cortes histológicos de todos los grupos experimentales, tanto alimentados como ayunados, con el fin de ver el porcentaje existente de células binucleadas. Se contaron un mínimo de 400 células por grupo y se pudo observar que el porcentaje de células binucleadas era similar en todos los grupos, variando solamente de un 8,5 a un 13 %. Consideramos pues que el conteo de los núcleos es

un índice válido de celularidad en nuestras condiciones experimentales.

Cuando los núcleos se expresan por gramo de hígado (fig.6), se encuentra una figura similar, aunque no completamente paralela, a la del P-DNA. Los animales de 5 días tienen el mayor número de núcleos/g de hígado de todos los grupos, lo mismo que sucedía con el DNA. El número de núcleos/g disminuye de los 5 a los 10 días pero a pesar de ello continúa siendo significativamente más alto que en los controles, igual que ocurre en los animales de 20 y 30 días. Los datos de DNA y número de núcleos sugieren, pues, que el tamaño de las células es más pequeño en los animales jóvenes que en los adultos. Tras 24 horas de ayuno en número de núcleos aumenta, cuando se expresa por gramo de tejido, aunque este aumento no llega a tener significación estadística en los animales de 5 días.

Al calcular los núcleos-hígado total (fig.7), se observa que no hay variación de los 5 a los 10 días, de los 10 a los 20 hay un gran aumento que es proporcionalmente mayor que el que existe entre los 20 y 30 días y entre los 30 días y adultos.

Tras las 24 h. de ayuno el número de núcleos por hígado total continúa al mismo nivel que cuando los animales estaban alimentados en todos los grupos.

Así pues, el contenido de DNA/núcleo es similar en todas las ratas jóvenes excepto en los animales de 10 días en que es más alto, sugiriendo una activación del proceso

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN EL NUMERO DE NUCLEOS HEPATICOS EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±E.S.M.)

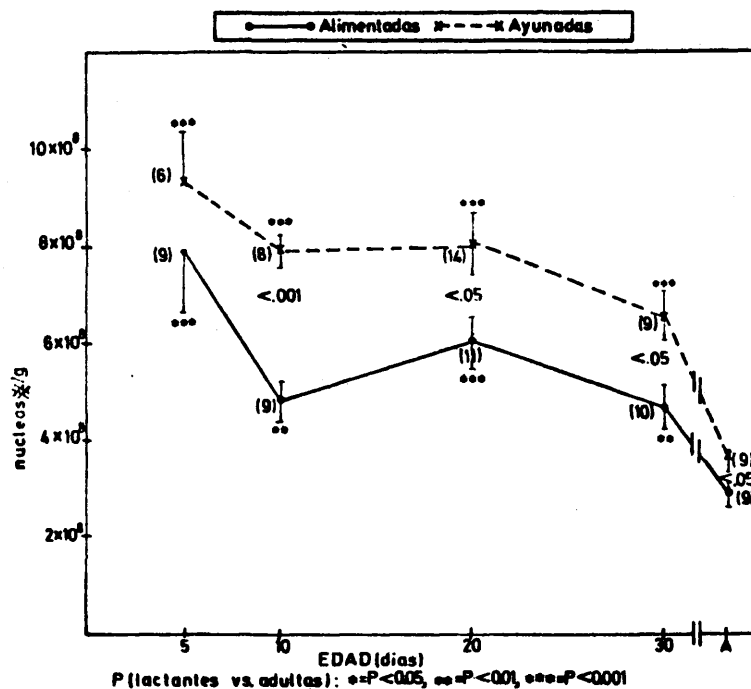


FIG. 6

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN EL NUMERO DE NUCLEOS/HIGADO EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±E.S.M.)

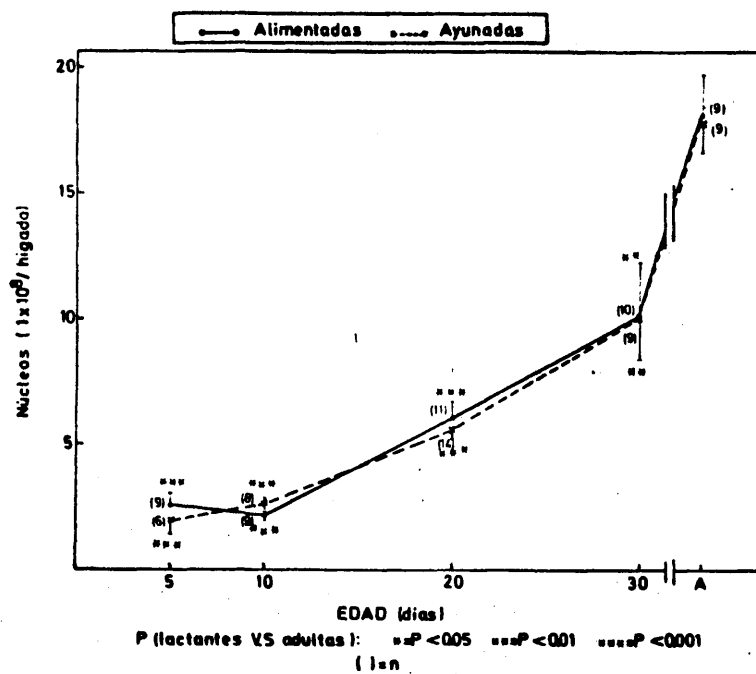


FIG. 7

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION DE AGUA EN EL HIGADO DE RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±ESM)

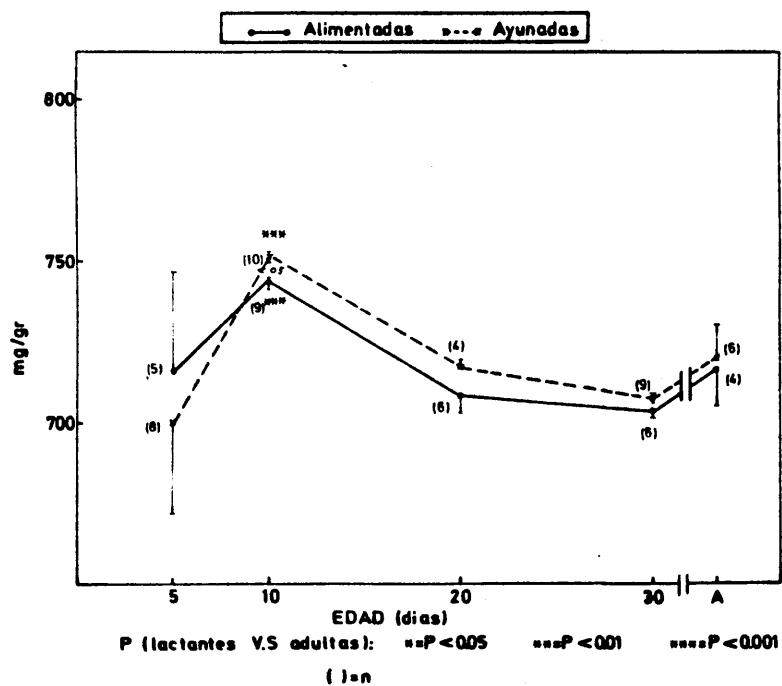


FIG.8

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION AGUA/NUCLEO EN EL HIGADO DE RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±ESM)

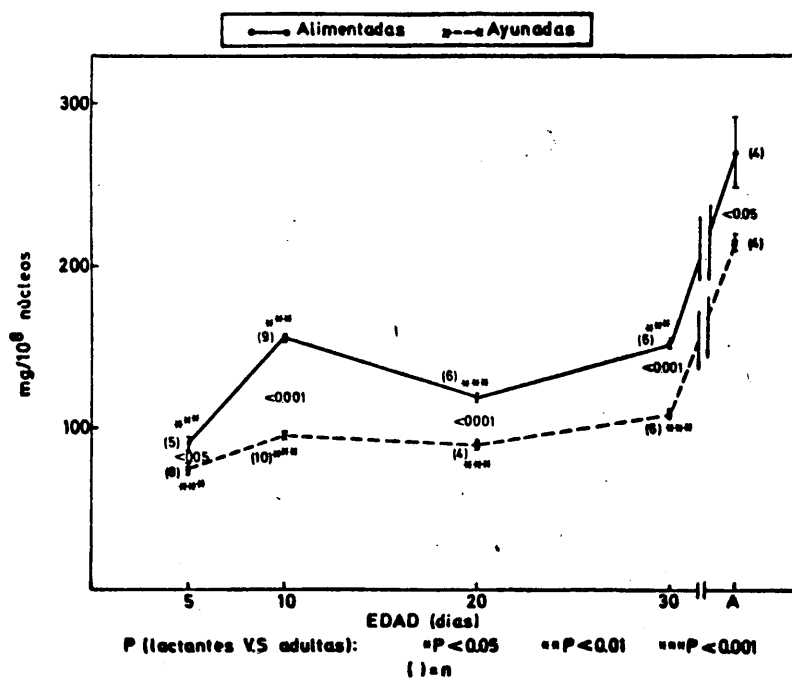


FIG.9

de división celular (Vendrely, 1955). También en las ratas de 10 días, la concentración de DNA/núcleo desciende con el ayuno lo que no sucede en los demás grupos, lo que sugeriría una cierta degradación celular en los hepatocitos de estos animales.

3- COMPOSICION DEL HIGADO

Debido al efecto de la edad y el ayuno sobre el número y tamaño celular, los resultados se expresan en dos formas: por gramo de tejido fresco y por núcleo.

La cantidad de agua presente en un gramo de hígado es similar en los animales de 5, 20, 30 días y adultos, mientras que es significativamente más alta ($p < 0.001$) en los animales de 10 días (fig.8). El ayuno no produce variación en el porcentaje de agua en los animales de 5, 20, 30 días y adultos, pero hay una pequeña disminución ($p < 0.05$) en los animales de 10 días, a pesar de la cual este valor sigue siendo superior al de los animales controles.

. Cuando se calcula la cantidad de agua por núcleo (fig.9), se ve que hay un aumento de los 5 a los 10 días, una pequeña bajada de los 10 a los 20 y luego hay un incremento de los 20 a los 30 días y de los animales de esta edad a los adultos.

Con el ayuno este parámetro disminuye significativamente en todos los grupos, lo que lógicamente contribuirá a la disminución del tamaño de los hepatocitos con el ayuno.

La concentración de proteínas, expresada por gramo de hígado, no difiere en ninguno de los grupos estudiados tanto alimentados como ayunados (fig.10).

Cuando se calcula la cantidad de proteínas/núcleo sucede algo similar a lo que sucedía con el agua: hay un aumento de los 5 a los 10 días para disminuir a los 20 días y aumentar después gradualmente hasta los animales adultos. Tras las 24 h. de ayuno no hay cambio en ninguno de los grupos experimentales salvo en los animales de 10 días, en los que hay una disminución significativa ($p < 0.01$) (fig.11).

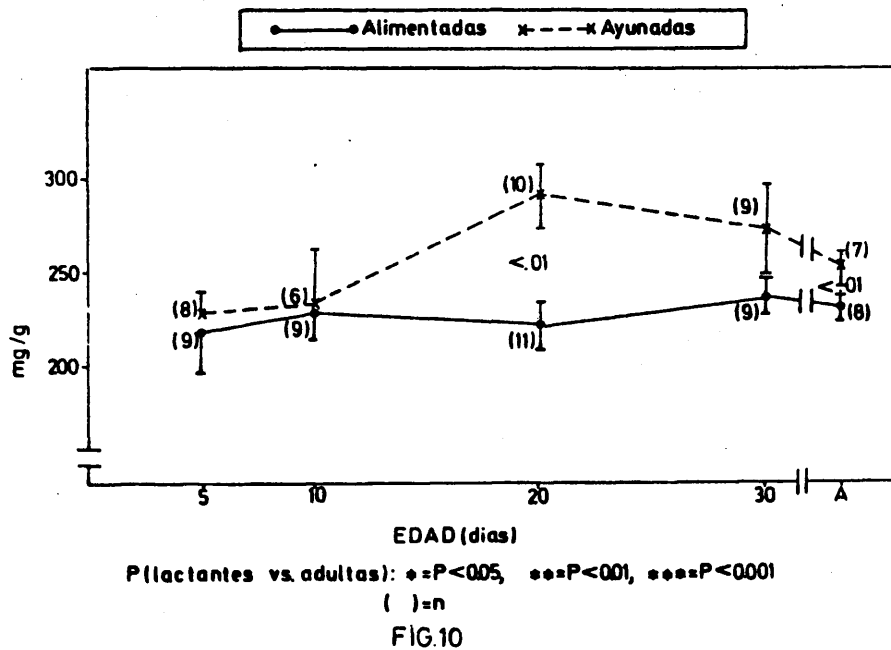
La concentración de fósforo de fosfolípidos/g (fig.12), es similar en todos los grupos alimentados, excepto en los animales de 20 días en que es más alta ($p < 0.05$ frente a los controles). Cuando los animales están ayunados la diferencia aparece en los animales de 10 días.

Calculando los fosfolípidos/núcleo (fig.13), volvemos a observar el mismo fenómeno que en el agua y las proteínas, aumento de los 5 a los 10 días, disminución de 10 a 20 y elevación de los 20 a los 30 y de los 30 días a los adultos.

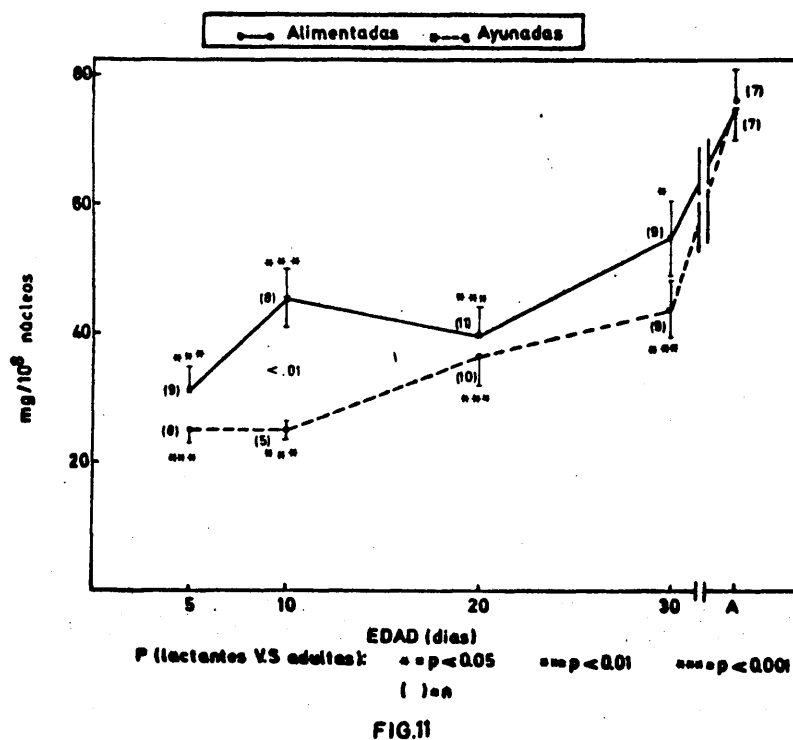
Con el ayuno no varía la concentración de proteínas en los animales controles ni en los de 5 y 30 días, pero hay una disminución en los de 10 y 20 días.

Todos estos resultados apoyan fuertemente la idea de que el décimo día de edad en la rata es un momento en el que se presentan grandes alteraciones en el desarrollo del hígado, lo que les obliga a una máxima degradación celular con el ayuno.

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION DE PROTEINAS HEPATICAS EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±ESM.)



EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION DE PROTEINAS/NUCLEO EN EL HIGADO DE RATAS LACTANTES Y ADULTAS (MEDIA±ESM.)



EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION HEPATICA DE
FOSFOLIPIDOS-P EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A)

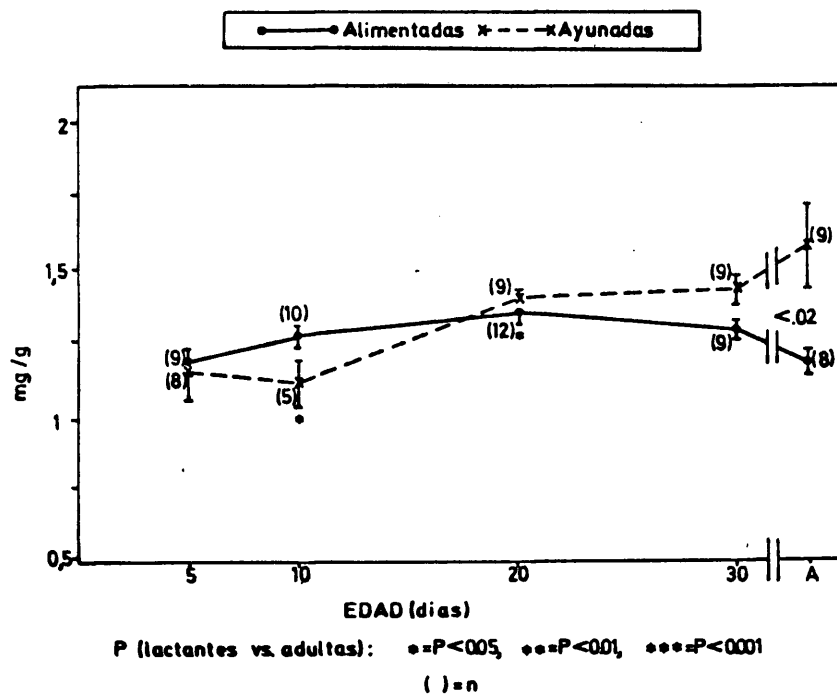


FIG.12

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION DE P DE FOSFOLIPIDOS/NUCLEO
DE RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±ESM)

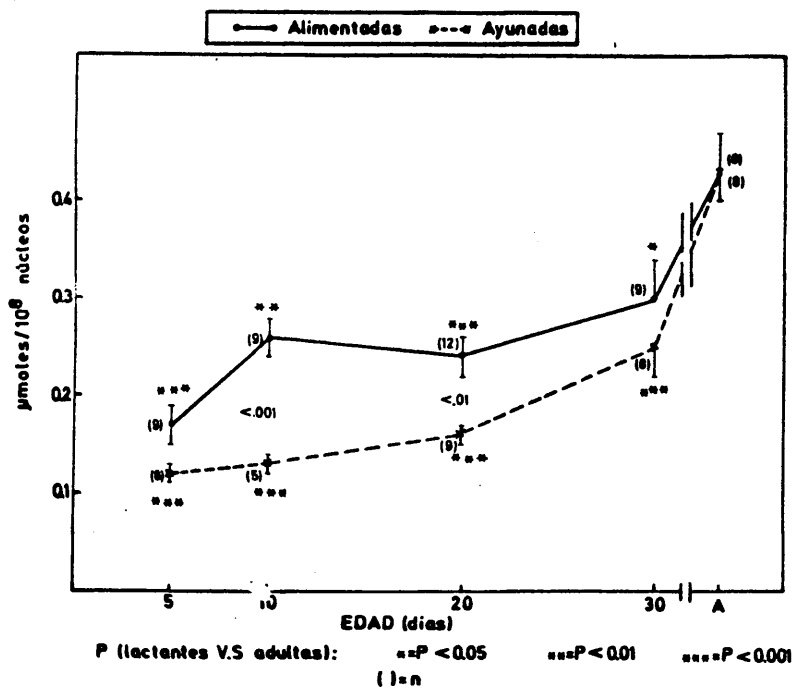


FIG.13

Como índices del metabolismo graso e hidrocarbonado hemos valorado la concentración hepática de glucógeno y la de ácidos grasos totales y libres.

El glucógeno (fig.14) es significativamente más bajo en los animales de 5 y 10 días ($p < 0.001$ y $P < 0.01$ respectivamente) que en los animales controles, lo que confirma los resultados obtenidos por otros autores en la rata y otras especies animales a las pocas horas del nacimiento (Avdalovic y Col., 1970; Kornfeld y Brown, 1962; Ballard y Oliver, 1963). A los 20 y 30 días los niveles de glucógeno han aumentado, de forma que la diferencia con los animales adultos no llega a ser significativa. Tras las 24 horas de ayuno los niveles de glucógeno disminuyen en todos los grupos ($p < 0.001$). Los animales de 5 y 10 días presentan una concentración de glucógeno cuando están ayunados que no difiere de los animales adultos; sin embargo, la bajada de glucógeno es mucho menor en los animales de 20 y 30 días que en los adultos, siendo por tanto significativamente más altos los niveles en estos dos grupos ($p < 0.001$).

Los ácidos grasos totales son significativamente más altos en los animales de 5, 20 y 30 días que en los adultos cuando están alimentados (fig.15). Cuando se someten al ayuno los ácidos grasos aumentan mucho en los animales controles ($p < 0.001$), como sucede normalmente, y hay también una elevación aunque menor ($p < 0.05$) en los animales de 30 días, como consecuencia de una elevada movilización de los depósitos periféricos de grasas. Sin embargo, los niveles

hepáticos de ac. grasos totales no difieren de los alimentados en los animales de 5 y 10 días y aún llegan a disminuir con el ayuno en los animales de 20 días de edad.

La concentración hepática de ac. grasos libres está más elevada en los animales de 5 y 10 días que en los animales adultos (fig.16), cuando están alimentados. La respuesta al ayuno en los animales jóvenes es también anómala en este parámetro, ya que mientras el grupo control presenta niveles más altos de ácidos grasos libres que cuando estaban alimentados ($p < 0.05$), el resto de los grupos mantienen el mismo nivel que entonces.

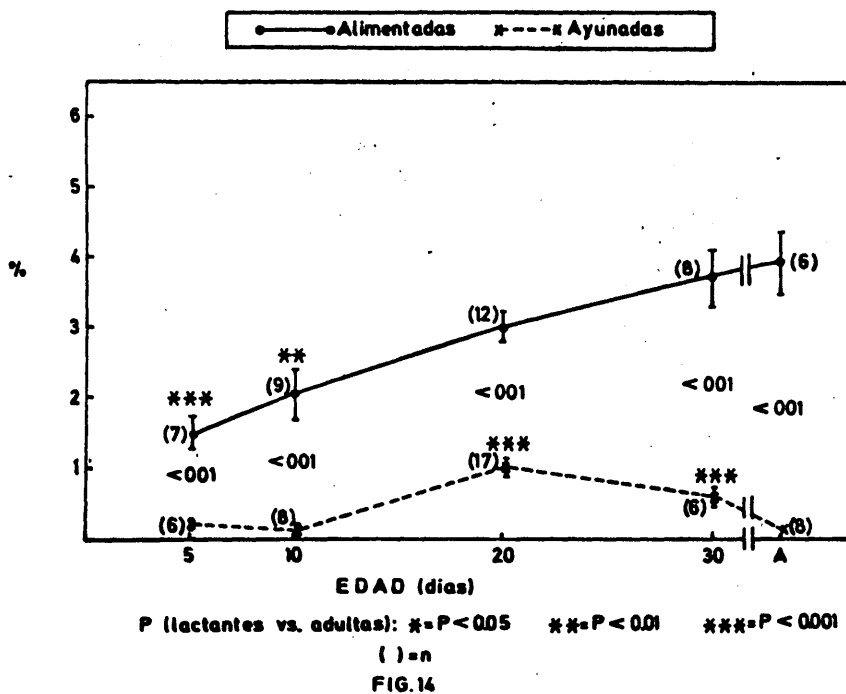
La diferencia entre los ácidos grasos totales y los libres representa los ácidos grasos esterificados, que siguen prácticamente el mismo modelo que los ácidos grasos totales, (fig.17).

4- METABOLITOS PLASMATICOS

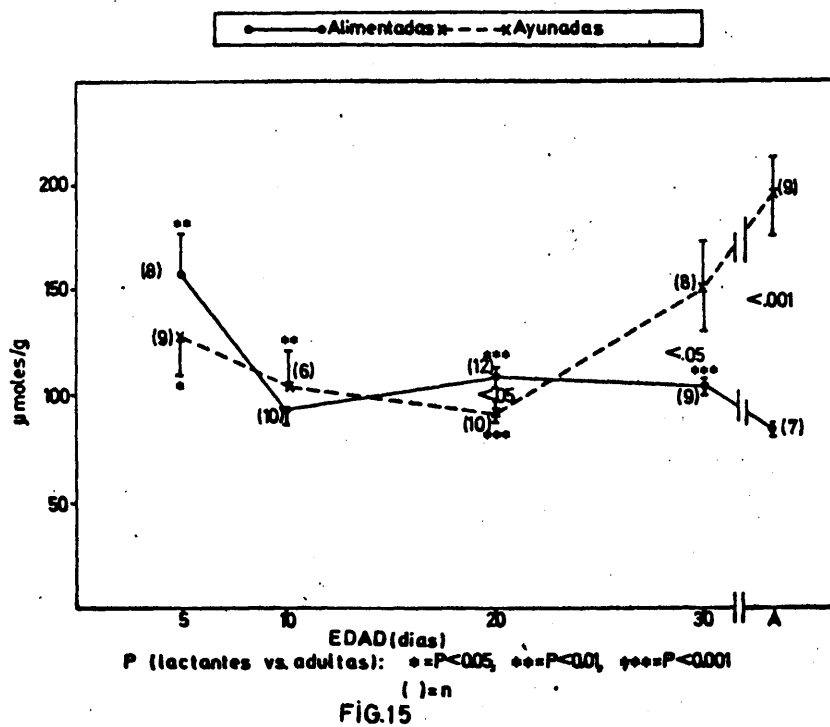
La concentración de cuerpos cetónicos circulantes es significativamente superior en los animales de 5, 10 y 20 días que en los controles (fig.18), lo que confirma otros datos de la literatura (Lockwood y Bailey, 1971; Drahotá y Col., 1964; Page y Col, 1971). Estos datos, junto con los elevados niveles de ac. grasos hepáticos encontrados por nosotros en las ratas jóvenes, demuestran la abundancia de lípidos en estos animales.

No existen datos en la literatura sobre las alteraciones que aparecen, en estos parámetros, en las ratas

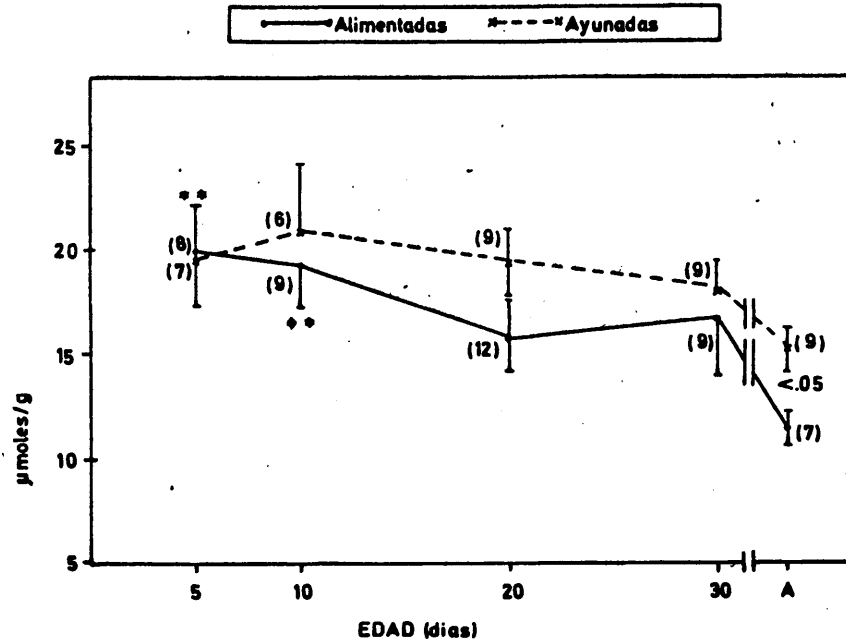
EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION HEPATICA DE GLUCOGENO EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±E.S.M.)



EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION HEPATICA DE ACIDOS GRASOS TOTALES EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS(A) (MEDIA±E.S.M.)

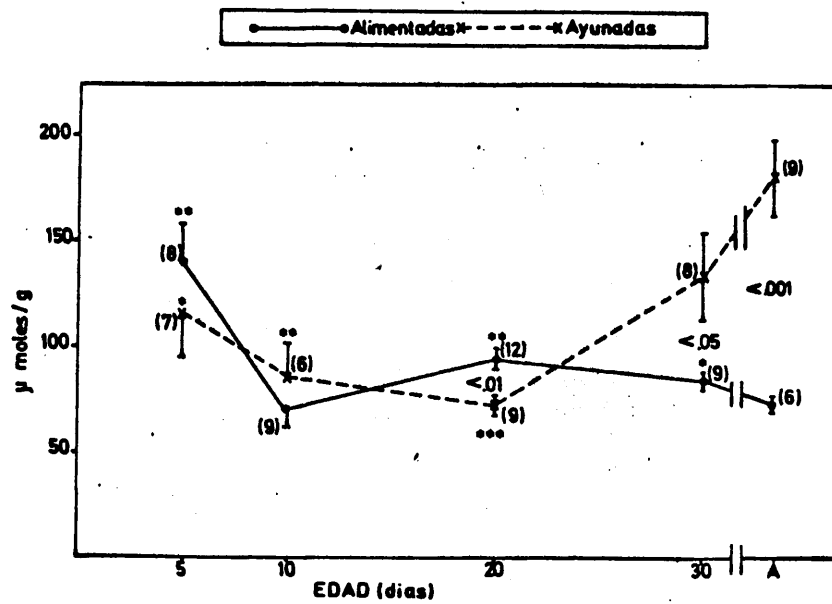


EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION HEPATICA DE ACIDOS GRASOS LIBRES DE RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±E.S.M.)



P (lactantes vs. adultos): * = $P < 0.05$ ** = $P < 0.01$ *** = $P < 0.001$
() = n
FIG.16

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION HEPATICA DE ACIDOS GRASOS ESTERIFICADOS EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±E.S.M.)



P (lactantes vs. adultos): * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$
() = n
FIG.17

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN EL NIVEL DE CUERPOS CETONICOS
EN SANGRE DE RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A)
(MEDIA±ESM.)

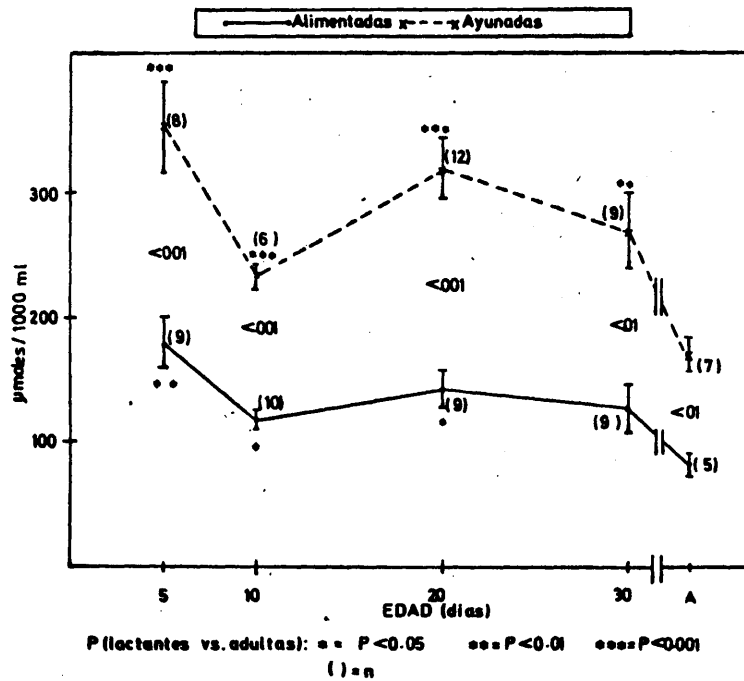


FIG.18

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LOS NIVELES DE GLUCOSA
PLASMATICA EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A)
(MEDIA±ESM.)

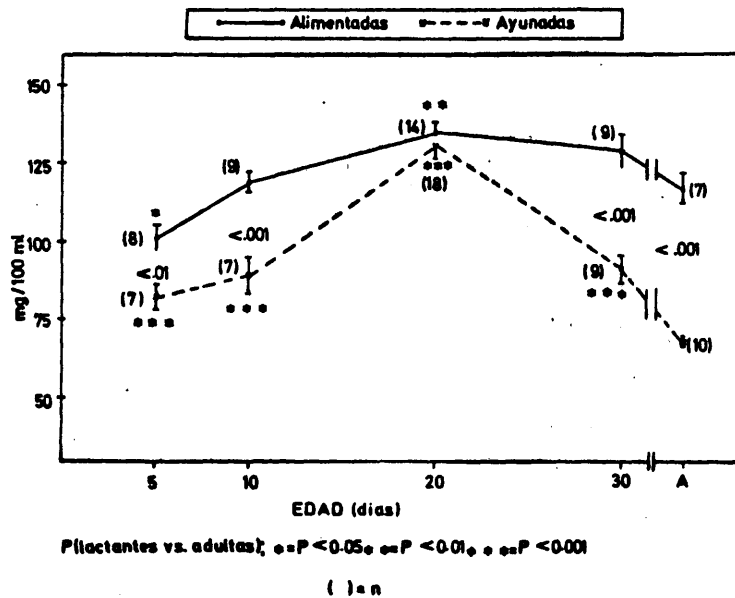
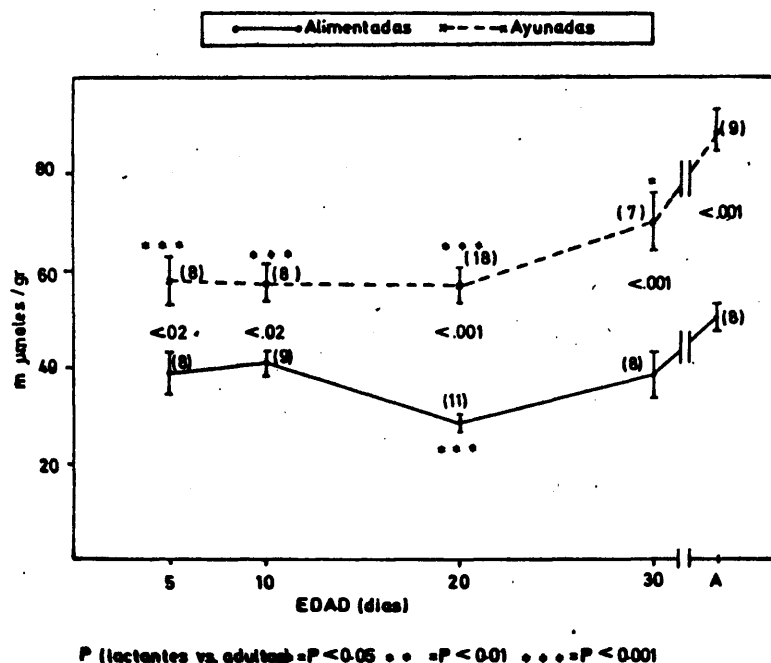


FIG.19

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION HEPATICA DE ACETIL-CoA EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±E.S.M.)



() = n
FIG.20

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION HEPATICA DE ACIDO CITRICO EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±E.S.M.)

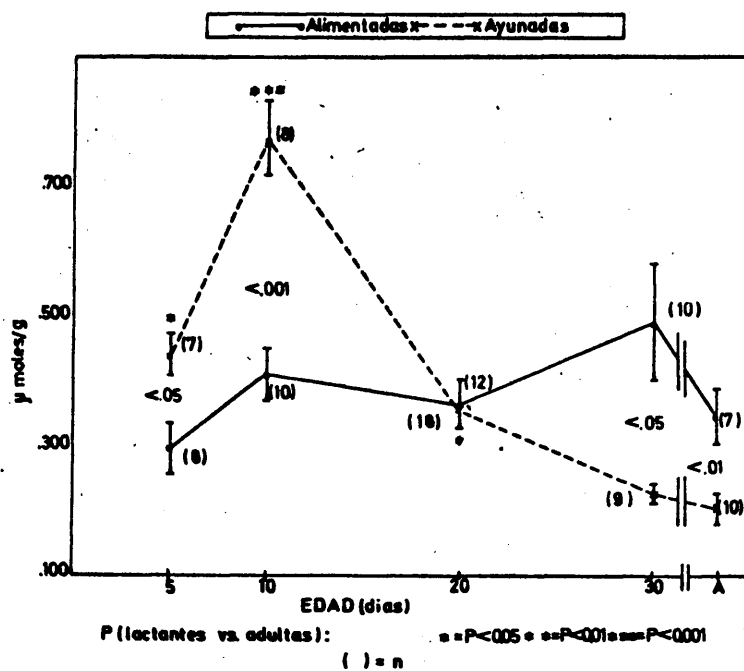


FIG.21



lactantes con el ayuno. Nosotros hemos encontrado que en estas condiciones los cuerpos cetónicos aumentan significativamente en todos los grupos, pero este aumento es aún mayor en todas las ratas jóvenes que en las adultas, por lo que aumentan más las diferencias con este grupo.

Los niveles de glucosa plasmática (fig.19) son algo más bajos ($p < 0.05$) en las ratas de 5 días que en las adultas; a los 10 días desaparece esta diferencia, mientras que a los 20 días de edad los animales presentan unos niveles de glucosa circulante más altos que los controles ($p < 0.01$), volviéndose a igualar con estos últimos a los 30 días de edad.

Después de las 24 horas de ayuno la glucosa baja en los animales controles; este descenso se presenta también en los animales de 5, 10 y 30 días, pero en ellos la bajada es menor. Este fenómeno se acentúa aún más en los animales de 20 días en los que la glucemia, tras el ayuno, permanece al mismo nivel que cuando estaban alimentados y por tanto la diferencia con los controles es muy grande.

5- ESTADO ESTACIONARIO DE METABOLITOS REGULADORES EN EL HÍGADO

La concentración de Ac-CoA en hígado es similar en los animales de 5, 10, 30 días y controles (fig.20), y más baja ($P < 0.001$) en los de 20 días, cuando están alimentados.

Con el ayuno el Acetil-CoA aumenta en todos los grupos, pero el mayor aumento corresponde a los controles,

apareciendo diferencias significativas en los animales de 5, 10 y 20 días ($p < 0.001$) y en los de 30 días ($p < 0.05$) respecto a las ratas adultas.

Los niveles de ácido cítrico no son diferentes en ninguno de los grupos estudiados cuando los animales están alimentados (fig.21). Sin embargo, la respuesta al ayuno es muy distinta. En los animales controles los niveles hepáticos de citrato disminuyen con el ayuno ($p < 0.01$), como se ha visto en otras ocasiones (Herrera y Freinkel, 1968; Herrera y Col., 1969); los animales de 30 días se comportan también normalmente, disminuyendo sus niveles de cítrico. Sin embargo, los animales de 20 días mantienen la misma concentración hepática de cítrico que cuando estaban alimentados y en contra de lo que ocurre en los adultos, en los animales de 5 y 10 días, el ayuno produce una elevación significativa de este parámetro.

Los niveles de ac. pirúvico (fig.22) no difieren con respecto a los controles en ninguno de los grupos, cuando están alimentados. Lo mismo que en el caso del ácido cítrico, las diferencias aparecen tras el ayuno. Mientras que los controles se comportan como normalmente (Williamson y Col., 1967), disminuyendo sus niveles de pirúvico ($p < 0.01$), los animales jóvenes conservan los mismos niveles que cuando estaban alimentados, apareciendo en todos los casos diferencias significativas con respecto a los adultos.

El ácido láctico (fig.23) es significativamente más alto en los animales de todos los grupos jóvenes estudia

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION HEPATICA DE
ACIDO PIRUVICO EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±E.S.M.)

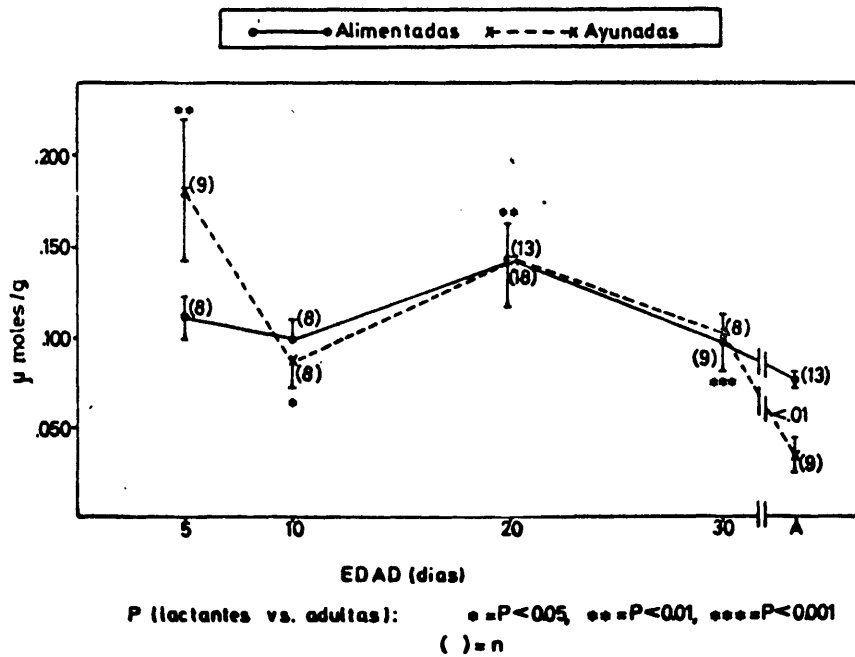


FIG. 22

EFFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA CONCENTRACION HEPATICA DE
ACIDO LACTICO EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±E.S.M.)

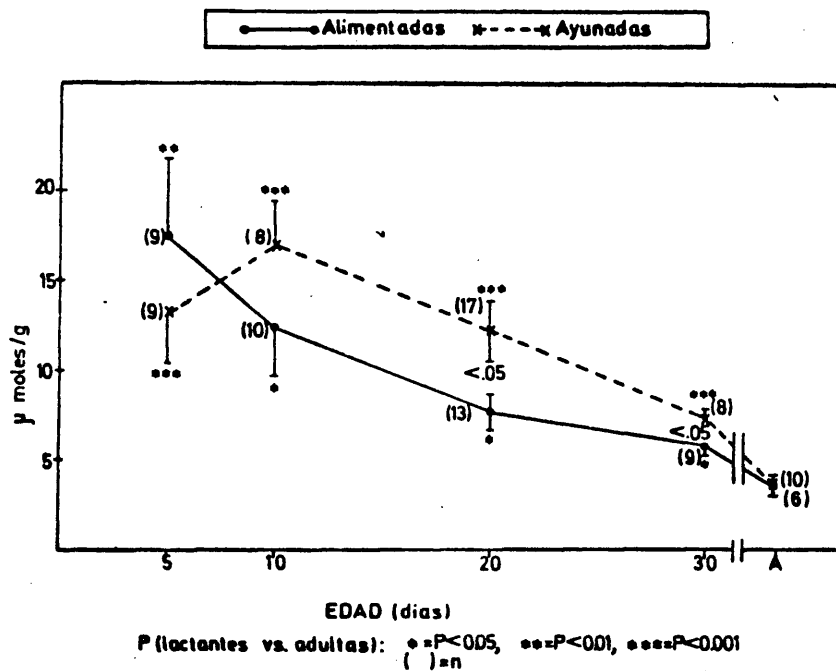


FIG. 23

EFCIO DE 24 HORAS DE AYUNO EN LA RELACION ACIDO LACTICO/ACIDO PIRUVICO
HEPATICOS EN RATAS LACTANTES Y ADULTAS (A) (MEDIA±E.S.M.)

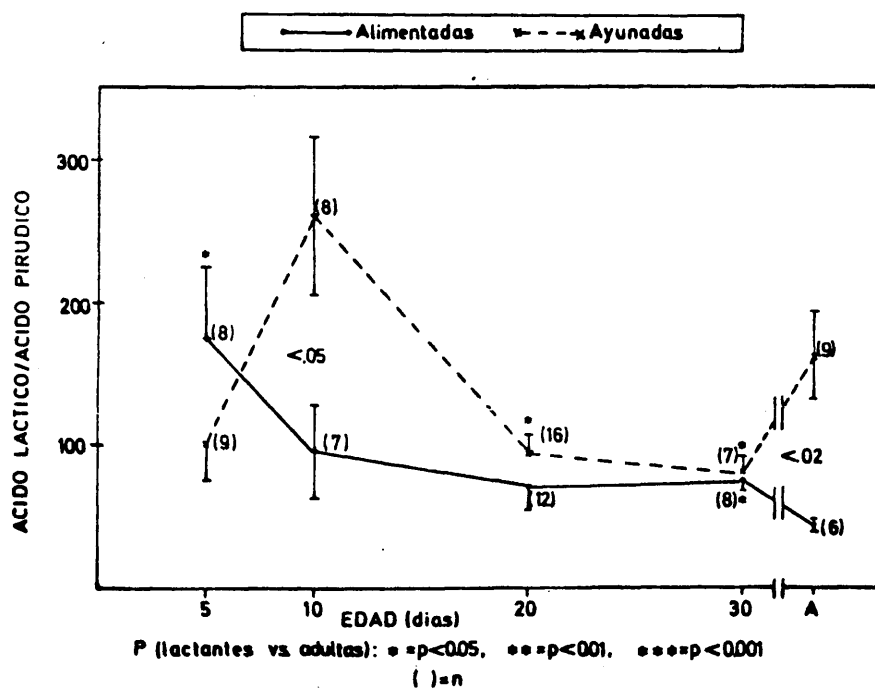


FIG. 24

dos que en los controles, tanto cuando están alimentados como cuando están ayunados.

La relación láctico/pirúvico nos indica la de NADH/NAD que existe en el citoplasma (Williamson y Col., 1967), por lo que es aún más interesante que ambos parámetros por separado. Esta relación es más alta en los animales jóvenes que en los adultos (fig.24), aunque esta diferencia tiene significación estadística solamente en los animales de 5 y 30 días, debido posiblemente a la gran dispersión de los datos. Con el ayuno la relación NADH/NAD se eleva en los animales adultos y de 10 días, como ocurre normalmente, permaneciendo en los demás grupos en los mismos niveles que cuando estaban alimentados.

6- GLUCONEOGENESIS "IN VIVO"

Con el propósito de estudiar la actividad gluconeogénica "in vivo" de los animales lactantes, las ratas correspondientes a cada edad y estado alimenticio se dividieron en dos subgrupos, a uno de los cuales se le inyectó ac. pirúvico-3-C¹⁴ en concentración traza y al otro ácido pirúvico en concentración sustrato. Las cantidades absolutas de pirúvico administradas fueron elegidas en función del peso de los animales (para más detalles ver sección IX-1 de Materiales y Métodos).

a- Radiactividad total en sangre

Los resultados correspondientes al porcentaje de radiactividad por unidad de volumen de sangre, en función

de las c.p.m. inyectadas a tiempo "0" (100%) se resumen en las figuras 25 a 29. Como era de esperar, la cantidad de radiactividad que aparece en 100 μ l de sangre disminuye a medida que aumenta la edad de los animales debido al incremento del volumen corporal y sanguíneo. Esta misma explicación es válida para justificar el aumento de este parámetro que se observa con el ayuno en todos los grupos. Es interesante hacer notar que en los animales de todas las edades, la cantidad de radiactividad en sangre no varía de los 10 a los 30 min. de la inyección del trazador. Aunque no se presentan datos, debido al pequeño número de animales ensayados, hemos de indicar que en los sacrificados a los 60 min. de la inyección tampoco existe un aumento de este parámetro. Estos resultados demuestran que ya a los 10 min. de la inyección, la absorción del pirúvico radiactivo ha sido total.

b- Formación de glucosa-C¹⁴

La cantidad de glucosa-C¹⁴ formada a distintos tiempos de la administración del pirúvico-C¹⁴, expresada en función de la cantidad de radiactividad inyectada y corregida por el peso corporal y el espacio de glucosa (sección IX-4 de Materiales y Métodos), se representa en las fig. 30 a 34.

En los animales de 5 días de edad, la cantidad de glucosa-C¹⁴ formada aumenta con el tiempo del experimento (fig. 30). Cuando el pirúvico se ha inyectado en concentraciones traza, puede observarse que el ayuno ha originado

RADIOACTIVIDAD EN SANGRE DE RATAS DE 5 DIAS DE EDAD INYECTADAS
CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

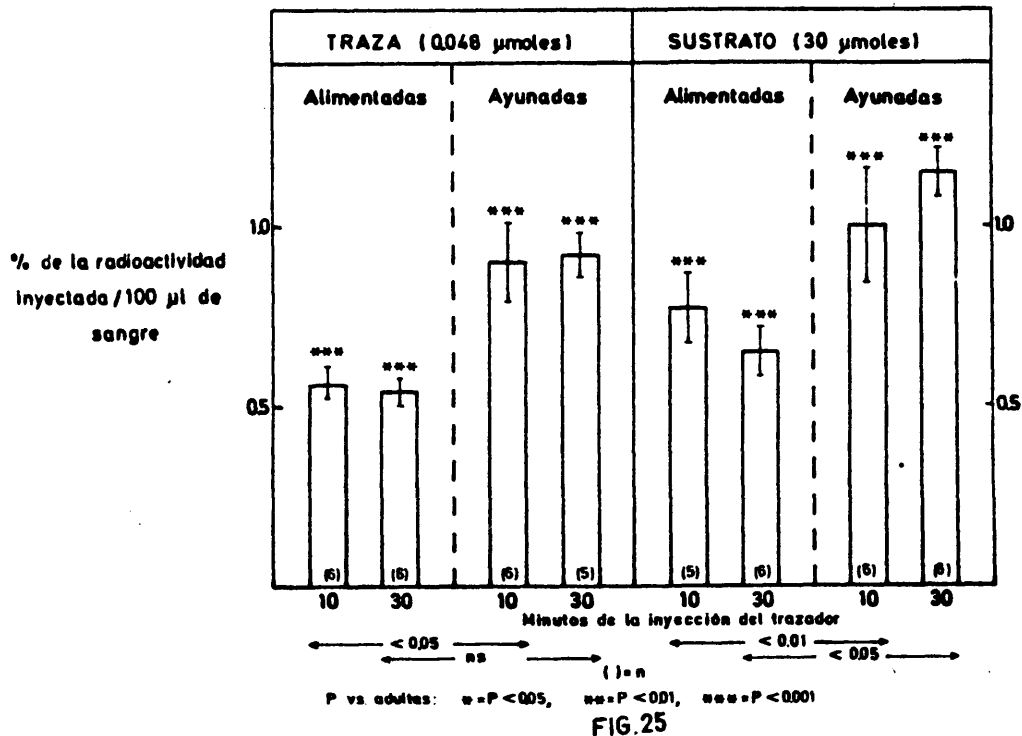


FIG.25

RADIOACTIVIDAD EN SANGRE DE RATAS DE 10 DIAS DE EDAD INYECTADAS CON
Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

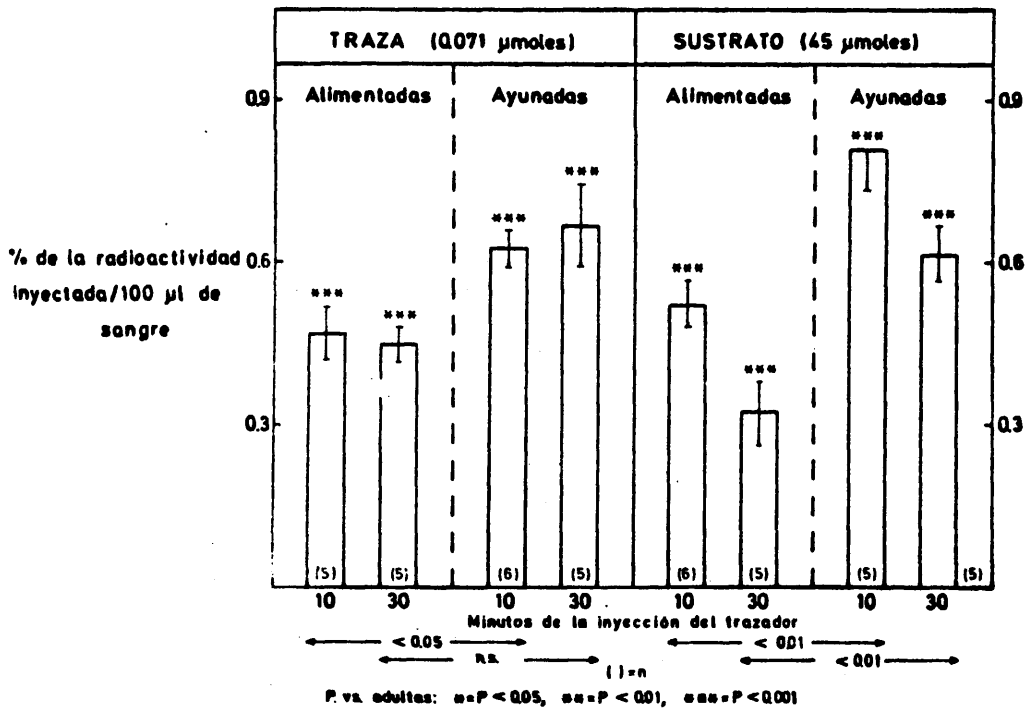


FIG.26

RADIOACTIVIDAD EN SANGRE DE RATAS DE 20 DIAS DE EDAD INYECTADAS CON
Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

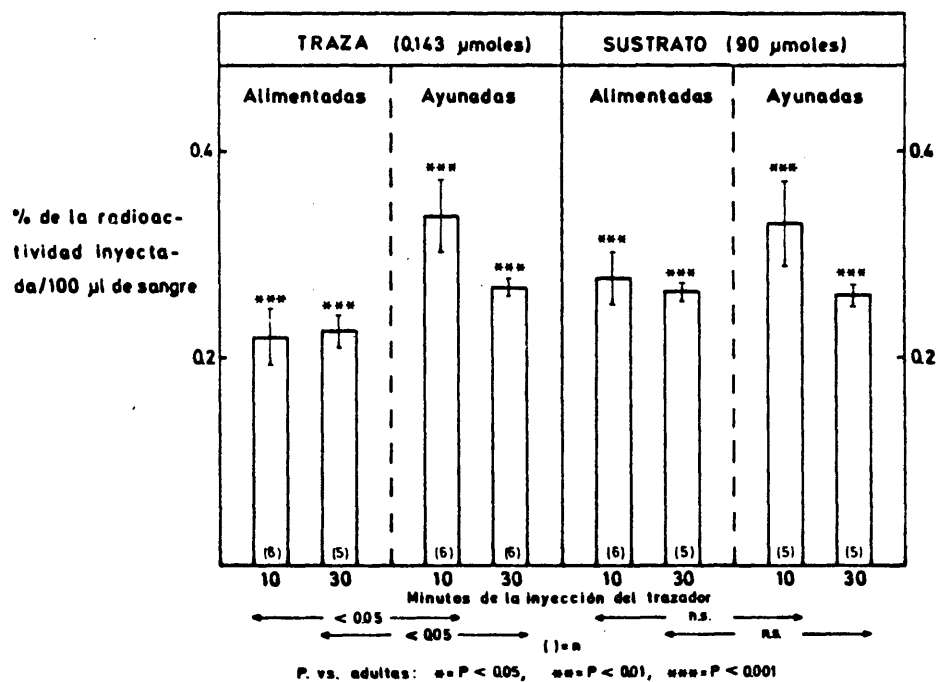


FIG. 27

RADIOACTIVIDAD EN SANGRE DE RATAS DE 30 DIAS DE EDAD INYECTADAS CON
Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

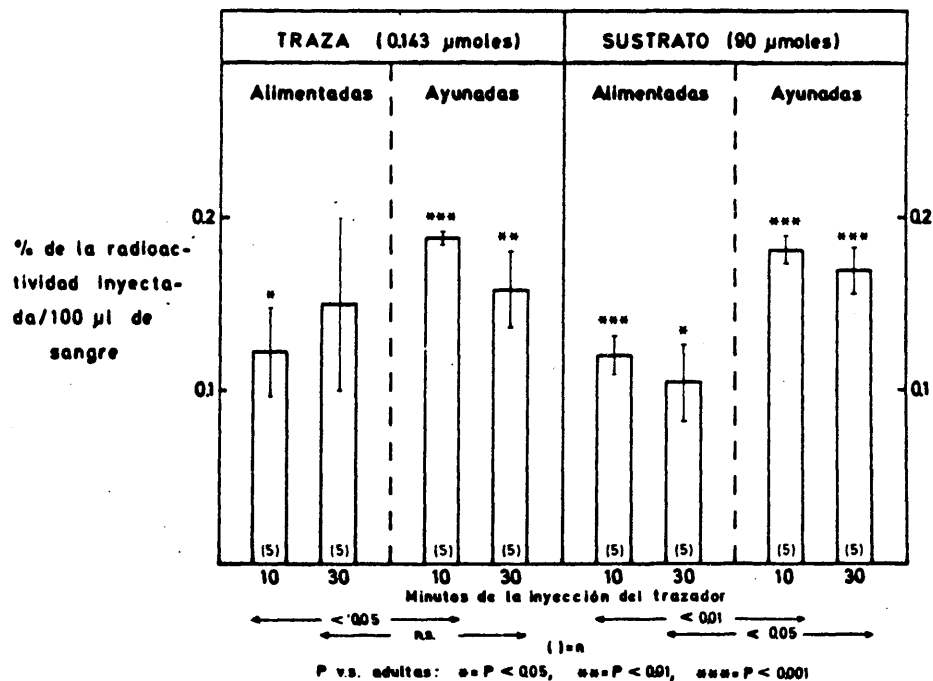


FIG. 28

RADIOACTIVIDAD EN SANGRE DE RATAS ADULTAS INYECTADAS CON Ac.
PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS ± E.S.M)

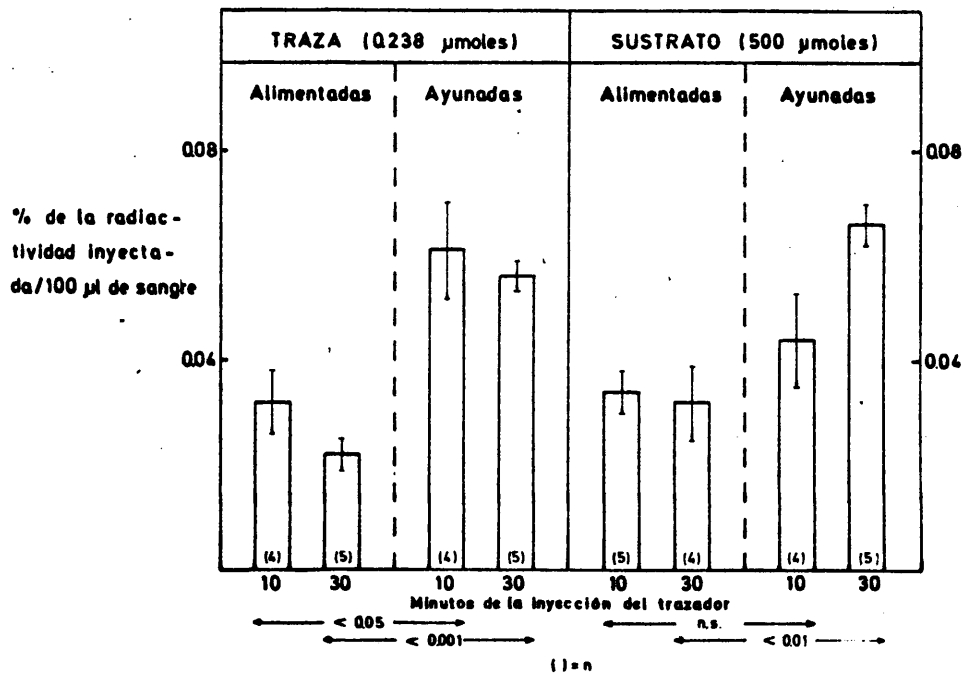


FIG. 29

GLUCONEOGENESIS "IN VIVO" A PARTIR DE Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ EN RATAS DE
5 DIAS DE EDAD (MEDIAS ± E.S.M)

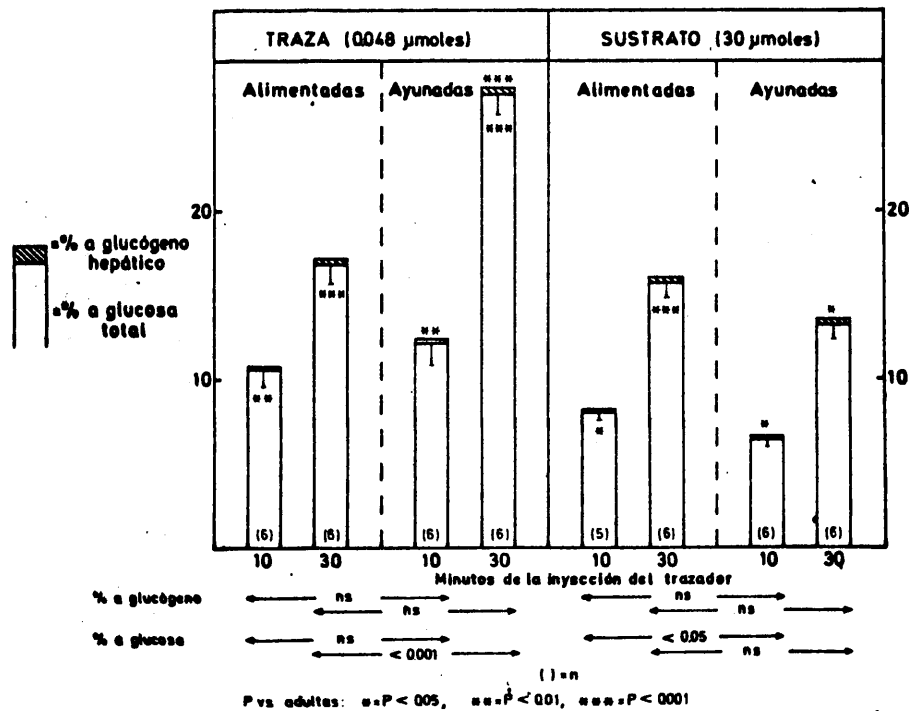


FIG. 30

GLUCONEOGENESIS "IN VIVO" A PARTIR DE Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ EN RATAS DE 10 DIAS DE EDAD (MEDIAS±E.S.M)

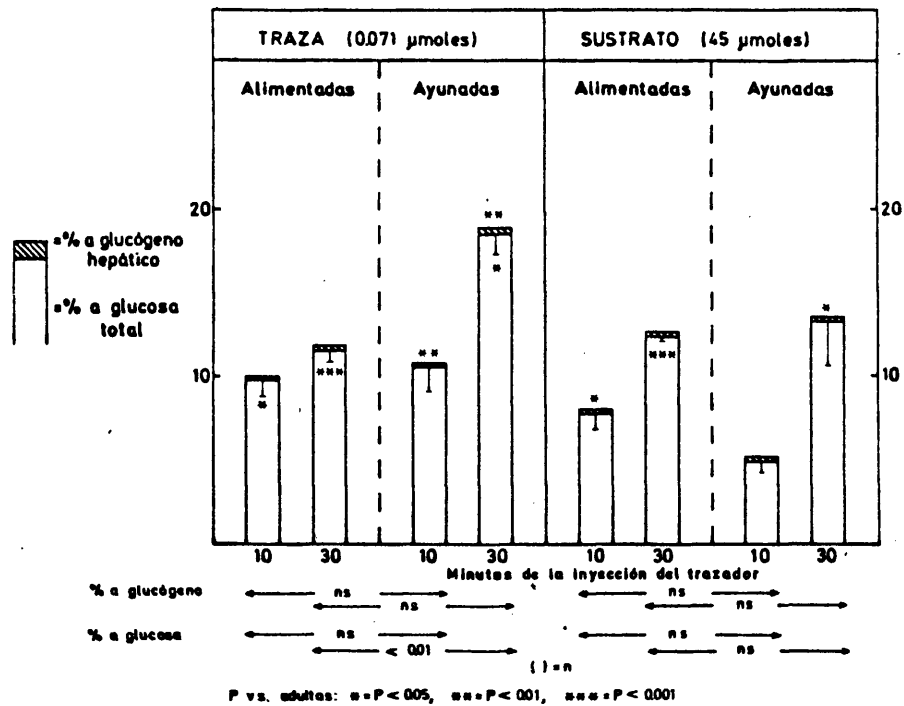


FIG. 31

GLUCONEOGENESIS "IN VIVO" A PARTIR DE AC. PIRUVICO-3-C¹⁴ EN RATAS DE 20 DIAS DE EDAD (MEDIAS±E.S.M)

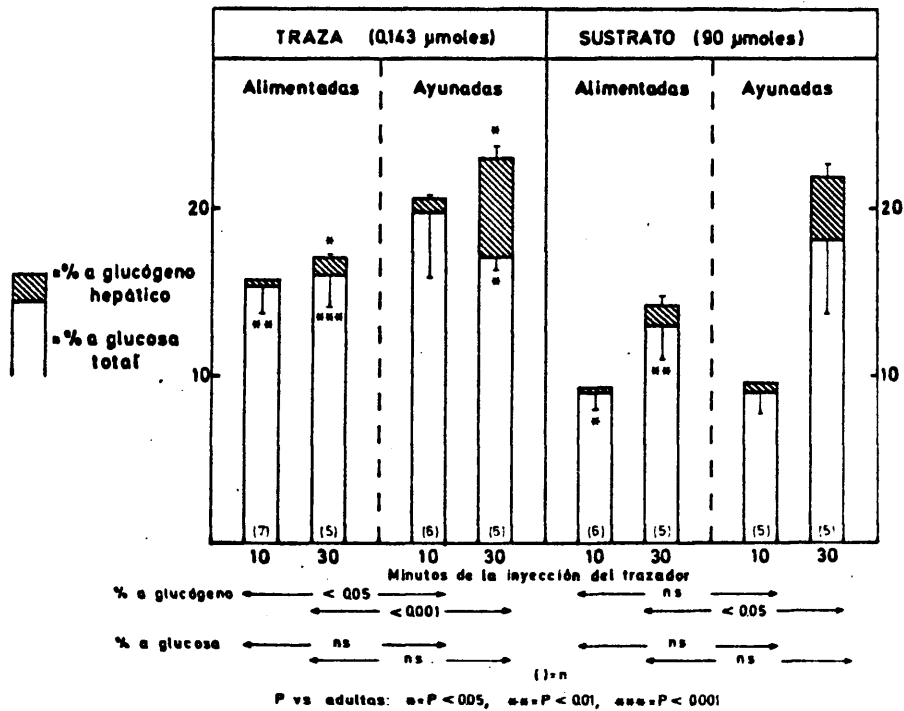


FIG. 32

un aumento significativo ($p < 0.001$) de la formación de glucosa- C^{14} a los 30 min. de la inyección. La administración de cantidades sustrato del piruvato hace desaparecer estas diferencias, e incluso hay una tendencia a que en las ratas en ayunas se produzca menos glucosa- C^{14} que en las alimentadas. Estos resultados indican que el aumento de la formación de glucosa cuando el precursor se administraba en cantidad traza no se debía a un aumento de gluconeogénesis, sino simplemente a diferencias en la concentración endógena de metabolitos fríos.

Resultados similares a los anteriores aparecen en las ratas de 10 días de edad (fig. 31).

En los animales de 20 días no se presenta un aumento significativo de la formación de glucosa- C^{14} ni siquiera cuando el pirúvico se había administrado en cantidades traza (fig. 32).

Los resultados son muy distintos en las ratas de 30 días, en las que la formación de glucosa- C^{14} aparece aumentada con el ayuno, tanto en concentraciones traza como sustrato del trazador, lo cual demuestra que en estos animales, a diferencia de los más jóvenes, el ayuno desencadena una verdadera activación de la formación de glucosa.

Muy similares son los resultados que se presentan en los controles adultos, donde, como se ha demostrado en otras ocasiones (Herrera y Col., 1969), el ayuno origina un aumento significativo de la síntesis de glucosa, el cual se observa tanto en concentraciones traza como sustrato del trazador (fig. 34).

Comparando los resultados obtenidos en los distintos grupos, puede observarse que la cantidad de glucosa- C^{14} formada es mayor en los animales jóvenes que en los adultos cuando están alimentados. Tras el ayuno disminuyen estas diferencias, aunque no llegan a desaparecer, debido a la falta de activación gluconeogénica en los animales más jóvenes.

c- Formación de glucógeno- C^{14}

El porcentaje de radiactividad administrada convertida a glucógeno hepático, en los animales de 5 días de edad, no cambia con el ayuno en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas (fig.30), lo mismo sucede en los animales de 10 días (fig.31). Sin embargo, en los animales de 20 días de edad, el ayuno origina un aumento significativo de la incorporación de pirúvico- C^{14} (administrado tanto en concentraciones traza como sustrato), a glucógeno hepático, este aumento es más intenso a los 30 que a los 10 min. de la inyección (fig.32). Resultados similares se presentan en los animales de 30 días (fig.33) y en los adultos (fig.34), aunque en estos últimos las diferencias entre animales comidos y ayunados tienen únicamente significación estadística a los 30 min.

Comparando los distintos grupos de animales jóvenes con los controles adultos se observa, que en condiciones de alimentación, el único grupo que presenta una mayor formación de glucógeno- C^{14} es el de las ratas de 20 días mientras que, en los demás grupos dicho parámetro no difiere

GLUCONEOGENESIS "IN VIVO" A PARTIR DE Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ EN RATAS DE 30 DIAS DE EDAD (MEDIAS±E.S.M)

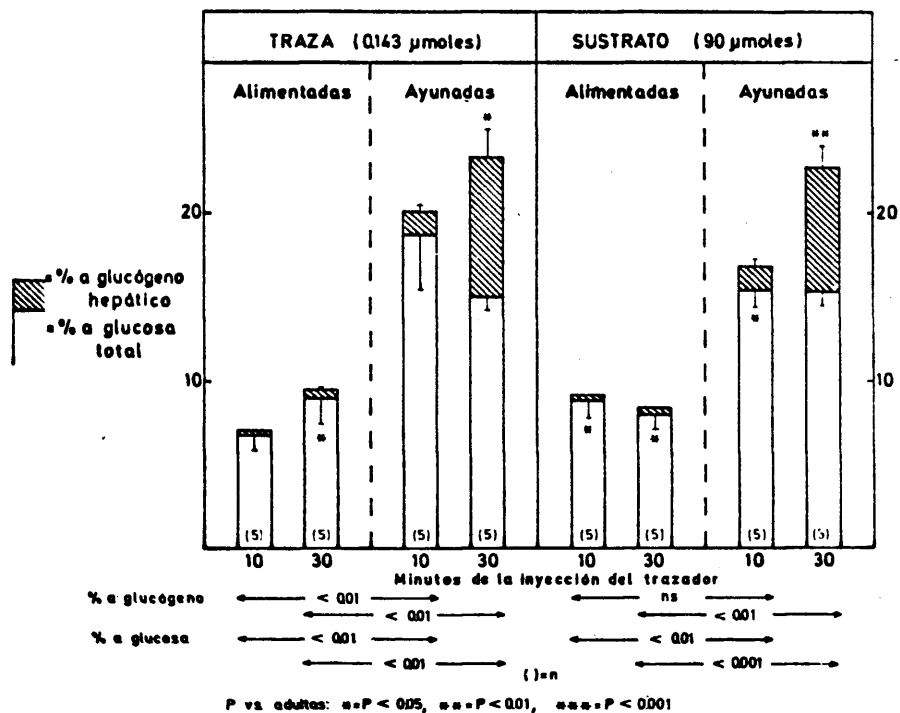


FIG. 33

GLUCONEOGENESIS "IN VIVO" A PARTIR DE Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ EN RATAS ADULTAS (MEDIAS±E.S.M)

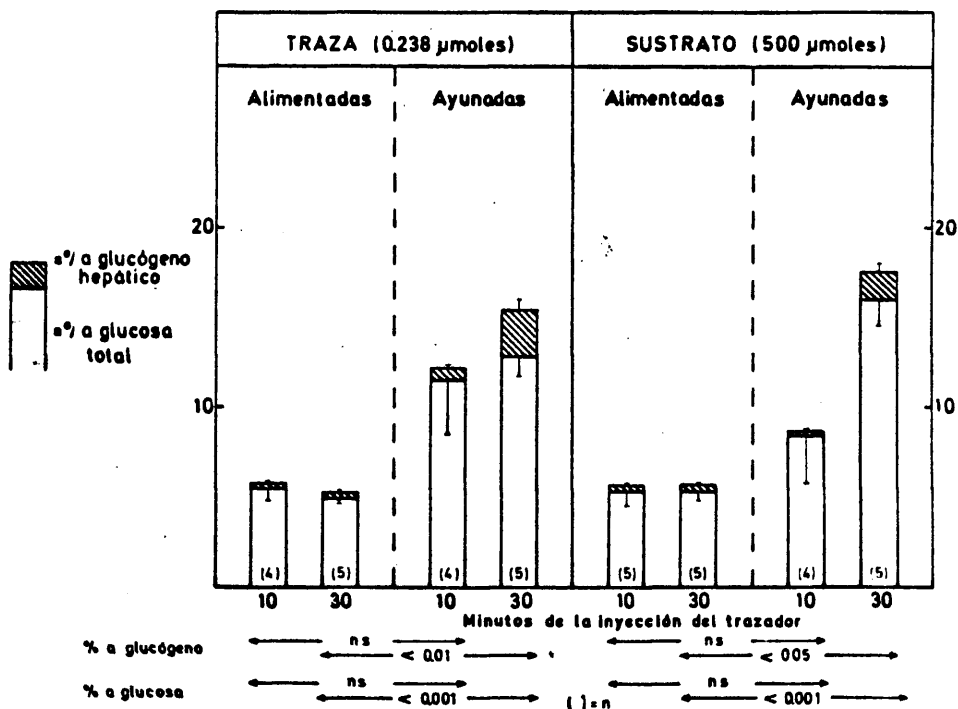


FIG. 34

con respecto a los adultos.

Tras el ayuno, la cantidad de glucógeno- C^{14} hepático sintetizado es menor en los animales de 5 y 10 días que en los controles, mientras que está significativamente aumentada con respecto a dicho grupo en los de 20 y 30 días.

d- Gluconeogénesis total

El porcentaje de pirúvico- C^{14} incorporado a glucosa circulante más el incorporado a glucógeno en el hígado constituye la mayor parte de la glucosa sintetizada a partir de dicho precursor, por lo que utilizamos este parámetro como índice de la gluconeogénesis total del animal.

Los resultados de la gluconeogénesis se resumen en la tabla 1. El ayuno produce una activación de dicho parámetro en los animales de 5 y 10 días solamente cuando el pirúvico- C^{14} se administra en cantidades traza, lo que sugiere que en estos animales no hay verdadera activación de gluconeogénesis con el ayuno. Cualitativamente los resultados obtenidos en los animales de 20 días son muy similares a los de 5 y 10 días aunque, a diferencia de los dos grupos anteriores, el ayuno produce un aumento de gluconeogénesis que en su mayor parte se debe al de la formación de glucógeno- C^{14} como vimos anteriormente.

Comparando con los resultados obtenidos en los adultos, la gluconeogénesis está aumentada en los animales de 5, 10 y 20 días en las dos condiciones experimentales (concentración traza y sustrato de pirúvico), cuando los animales están alimentados. Estas diferencias disminuyen,

T A B L A 1

Gluconeogénesis "in vivo" a partir de piruvato-C¹⁴ en animales lactantes y adultos.

	<u>Traza</u>		<u>Sustrato</u>	
	10 min.	30 min.	10 min.	30 min.
Adultos				
Al.	5.7±0.8	5.1±0.3	5.6±0.8	5.6±0.4
Ay.	12.1±3.2 NS	15.4±1.4 p<.001	8.6±2.7 NS	17.5±1.9 p<.001
5 días				
Al.	10.9 [*] ±1.2	17.1 ^{***} ±1.2	8.1 [*] ±0.5	15.9 ^{***} ±0.9
Ay.	12.3±1.4 NS	27.3 ^{***} ±1.3 p<.001	6.5±0.5 p<.05	13.4±0.8 NS
10 días				
Al.	10.0 [*] ±0.9	11.8 ^{***} ±0.7	7.9±1.0	12.5 ^{***} ±0.3
Ay.	10.6±1.5 NS	18.8±1.3 p<.01	5.2±0.7 NS	13.5±2.6 NS
20 días				
Al.	15.7 ^{**} ±1.7	17.1 ^{***} ±1.9	9.1 [*] ±1.0	14.2 ^{**} ±2.3
Ay.	20.5±4.1 NS	23.0 ^{**} ±1.0 p<.05	9.6±1.4 NS	21.8±4.8 NS
30 días				
Al.	7.0±0.9	9.4 [*] ±1.6	9.1 [*] ±1.0	8.3 [*] ±1.0
Ay.	19.9±3.2 p<.01	23.4 ^{**} ±1.7 p<.001	16.8 [*] ±1.1 p<.001	22.6±1.4 p<.001

p indica la significatividad entre los animales alimentados y ayunados.

Los asteriscos indican la significatividad frente a los animales adultos. (* = p < .05, ** = p < .01, *** = p < .001).

aunque no llegan a anularse, tras el ayuno debido a la mayor activación de gluconeogénesis que ocurre en los animales adultos en esta situación.

La respuesta al ayuno obtenida en las ratas de 30 días es similar a la que presentan los controles. La gluconeogénesis en las primeras continúa siendo, sin embargo, superior a la de las segundas.

e- Actividad específica de glucosa y glucógeno

Con la finalidad de obtener otra visión de los resultados anteriormente presentados, hemos considerado interesante determinar la actividad específica de la glucosa- C^{14} y glucógeno- C^{14} formados a partir del piruvato- C^{14} inyectado. Para ello hemos valorado las concentraciones de glucosa plasmática y glucógeno hepático en todos los grupos estudiados. Ambos parámetros son similares a los obtenidos en experimentos anteriores en estos animales y lo que más nos interesa resaltar aquí es que la administración de cantidades sustrato de pirúvico no ha afectado de forma significativa los niveles de dichos metabolitos con relación a los obtenidos en los animales inyectados con concentración traza de pirúvico, como se puede observar en las fig. 35 a 44.

La actividad específica de la glucosa en sangre aumenta con el ayuno en los animales de todas las edades estudiadas (fig. 45 a 49). Este parámetro es máximo a los 5 días y va disminuyendo progresivamente con la edad siendo estadísticamente significativa la diferencia de todos los

GLUCOSA EN SANGRE DE RATAS DE 5 DIAS DE EDAD INYECTADAS CON Ac.
PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±ESM)

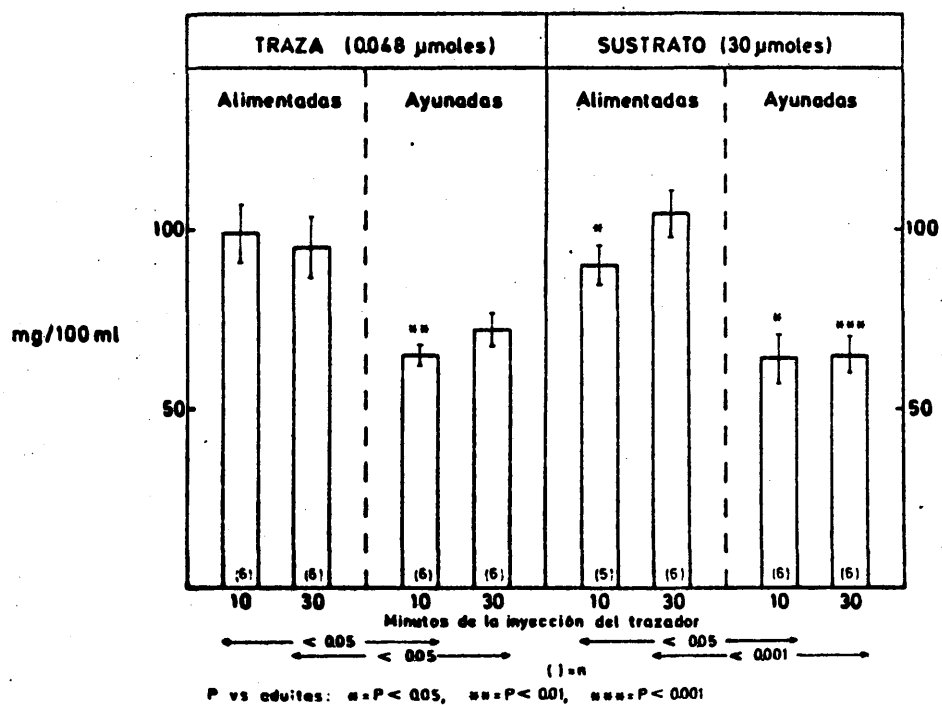


FIG. 35

GLUCOSA EN SANGRE DE RATAS DE 10 DIAS DE EDAD INYECTADAS CON Ac.
PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±ESM)

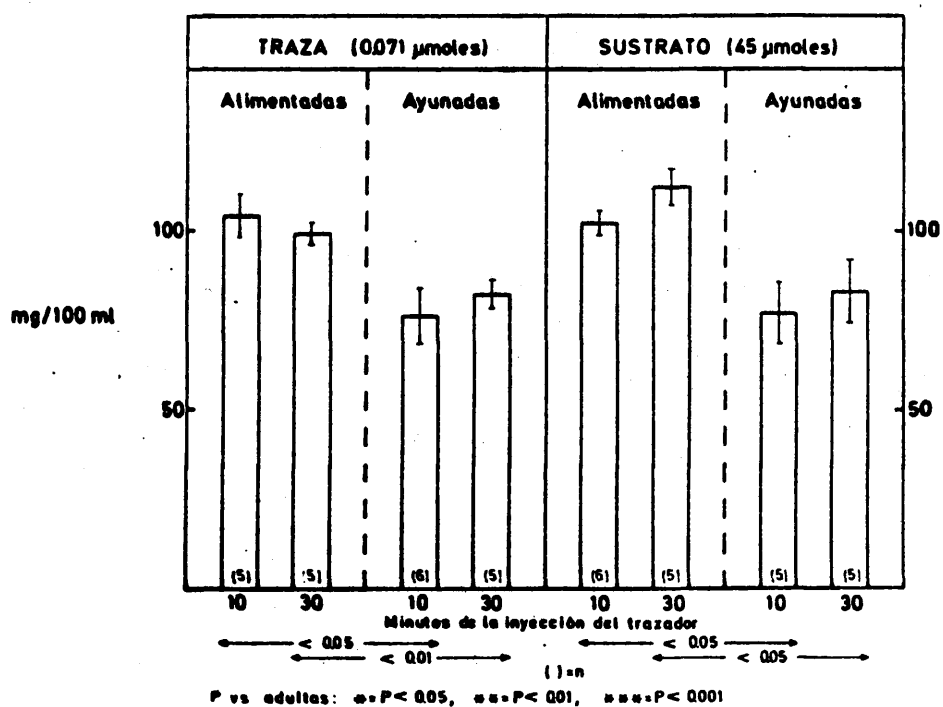


FIG. 36

GLUCOSA EN SANGRE DE RATAS DE 20 DIAS DE EDAD INYECTADAS CON
Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±ESM)

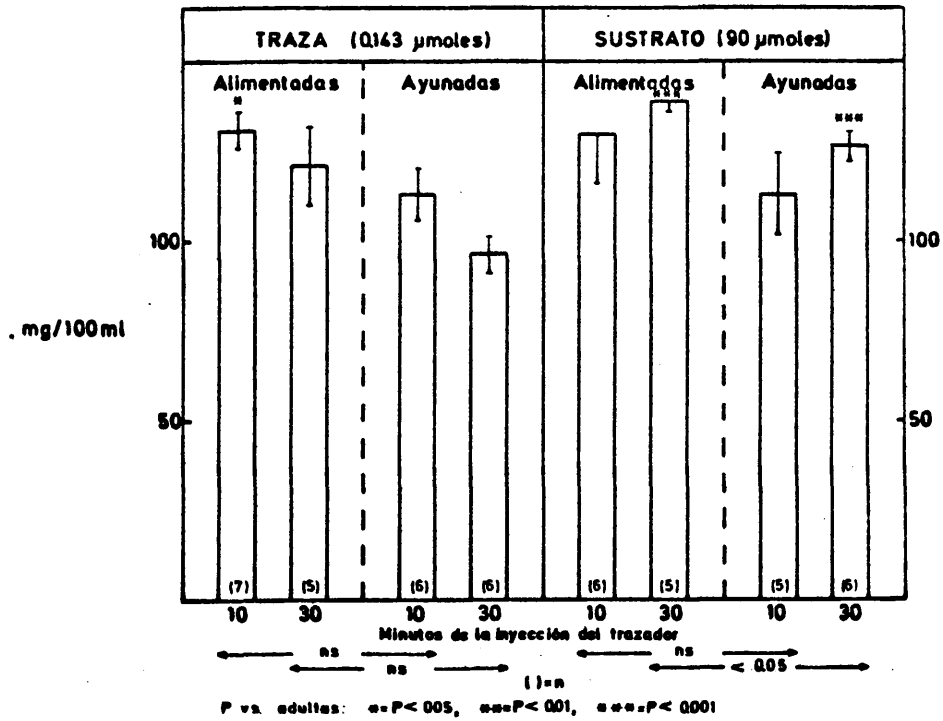


FIG.37

GLUCOSA EN SANGRE DE RATAS DE 30 DIAS DE EDAD INYECTADAS CON Ac.
PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

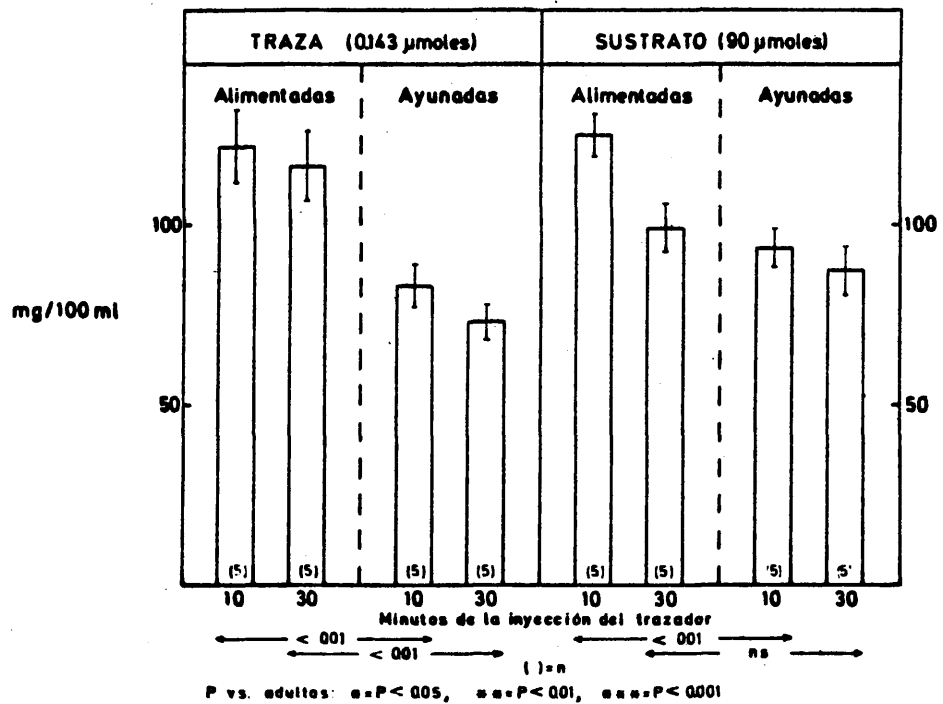


FIG.38

GLUCOSA EN SANGRE DE RATAS ADULTAS INYECTADAS CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

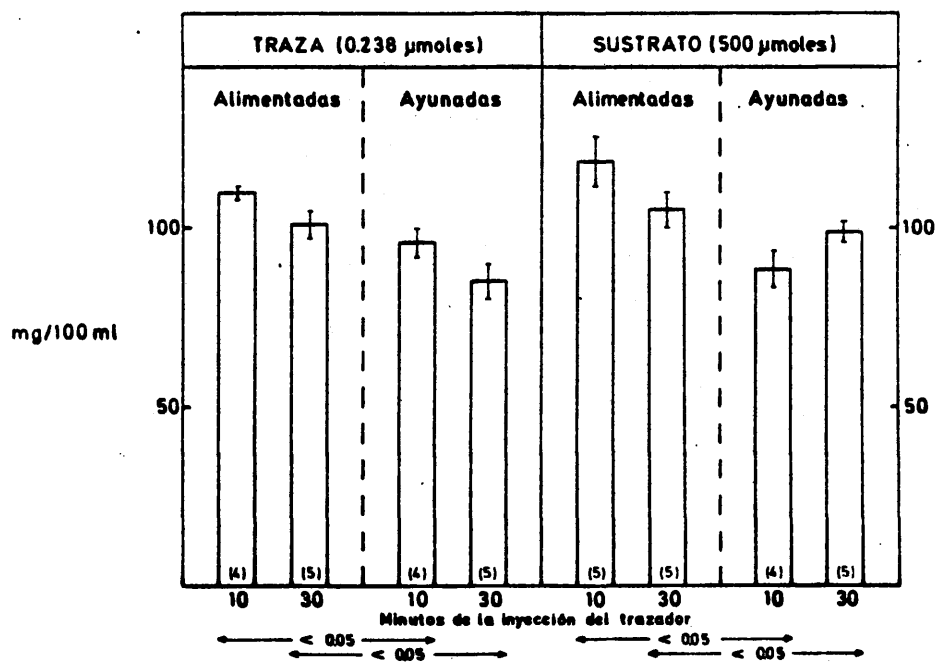


FIG. 39

GLUCOGENO EN HIGADO DE RATAS DE 5 DIAS DE EDAD INYECTADAS CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

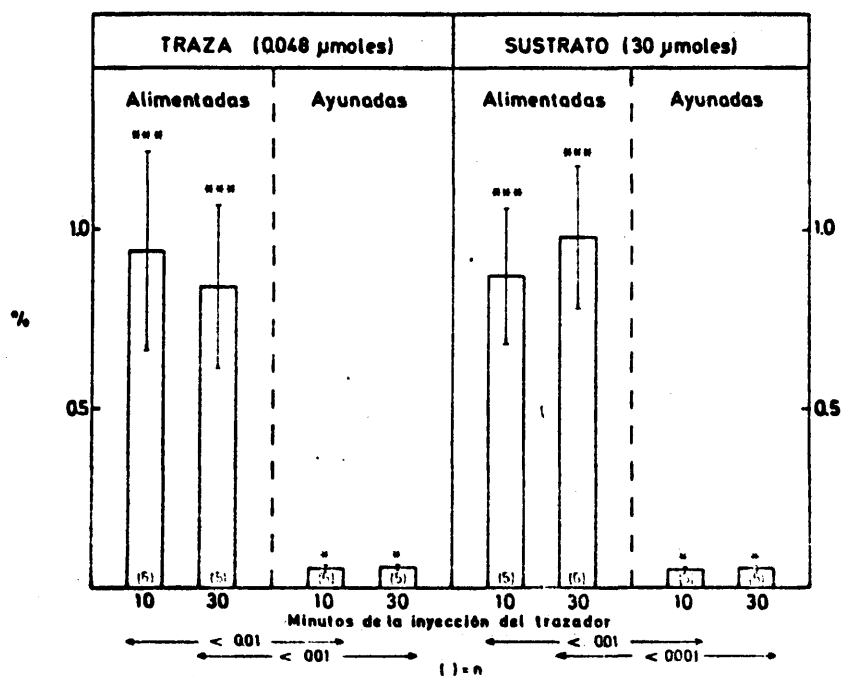


FIG. 40

GLUCOGENO EN HIGADO DE RATAS DE 10 DIAS DE EDAD INYECTADAS
CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

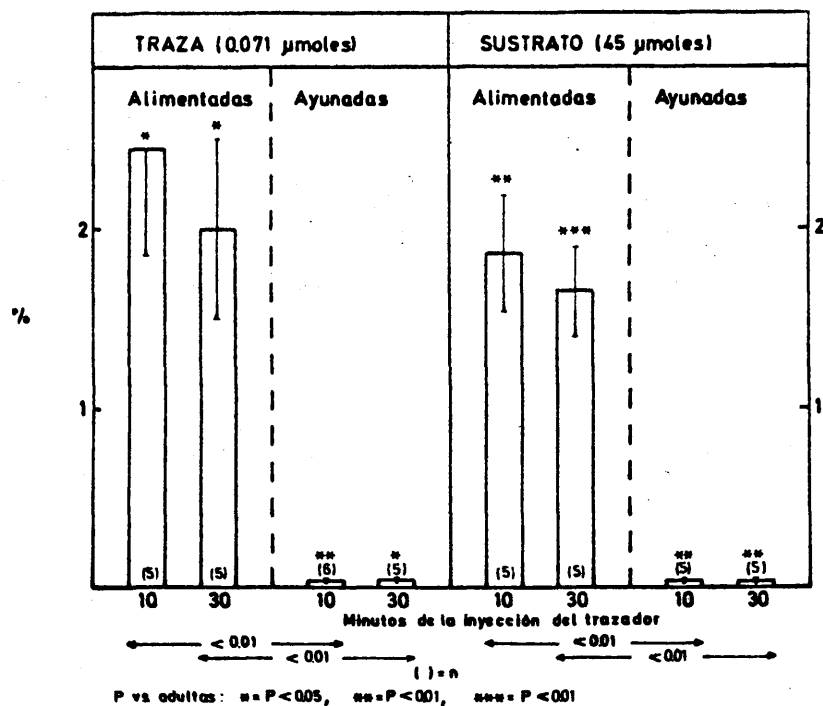


FIG. 41

GLUCOGENO EN HIGADO DE RATAS DE 20 DIAS DE EDAD INYECTADAS CON
Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

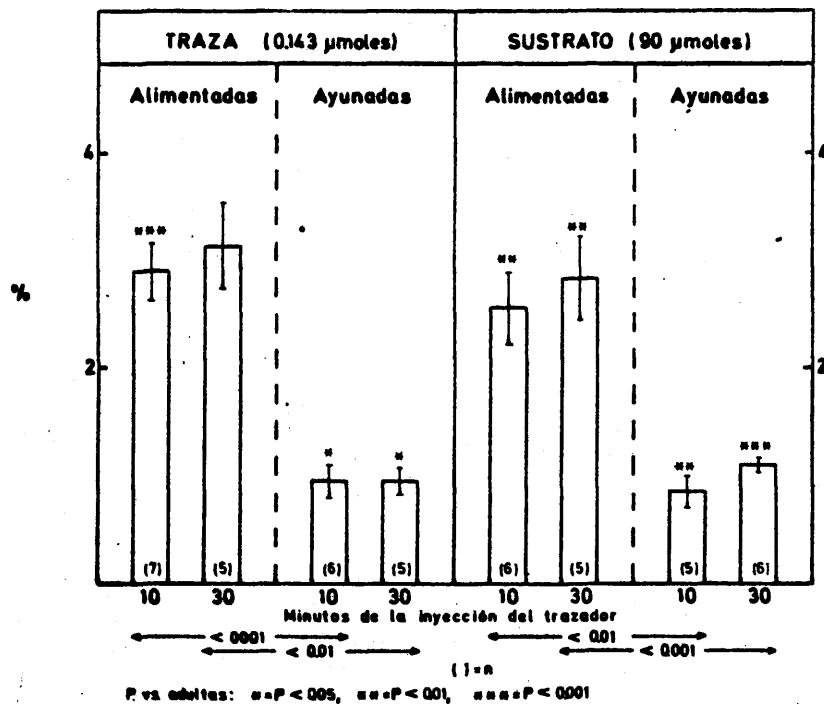


FIG. 42

GLUCOGENO EN HIGADO DE RATAS DE 30 DIAS DE EDAD INYECTADAS
CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±ESM)

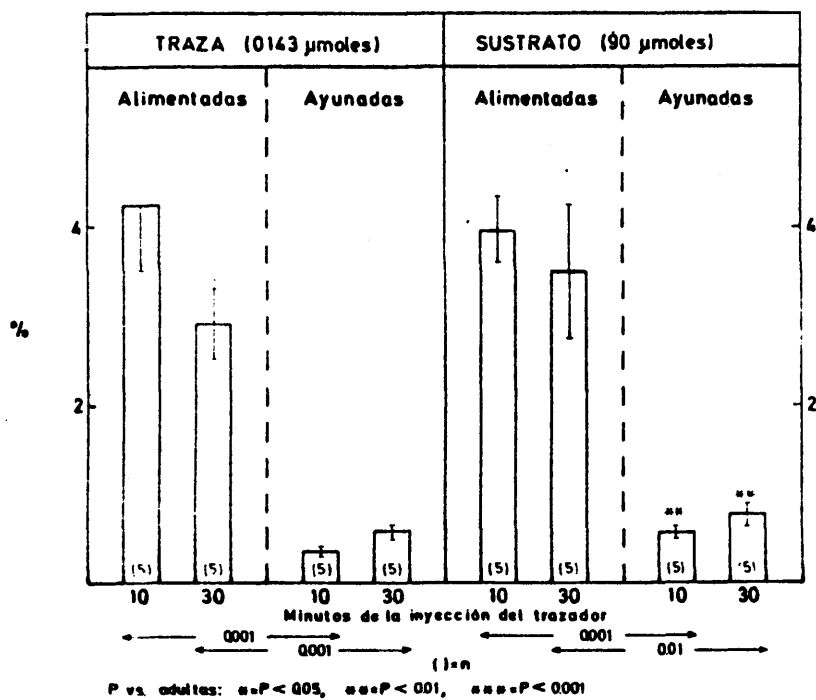


FIG 43

GLUCOGENO EN HIGADO DE RATAS ADULTAS INYECTADAS CON Ac.
PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±ESM)

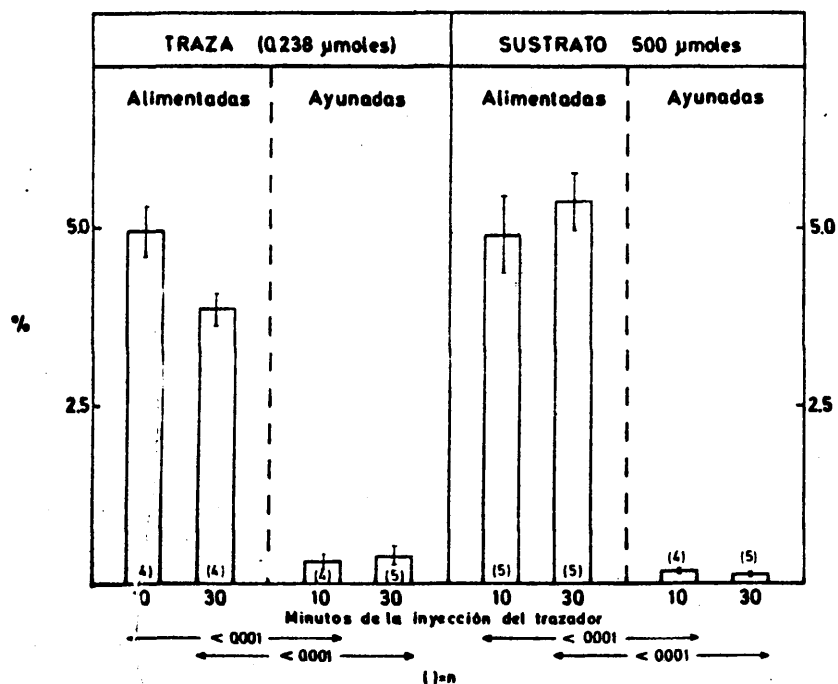


FIG.44

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA GLUCOSA PLASMATICA DE RATAS DE 5 DIAS DE
EDAD INYECTADAS CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS ± E.S.M)

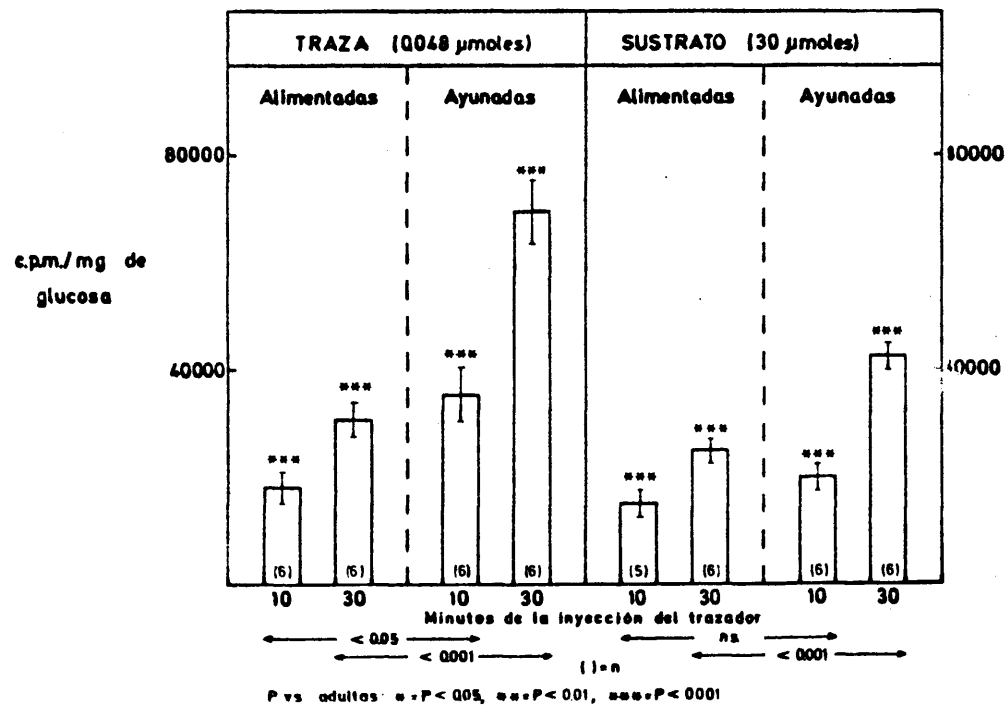


FIG.45

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA GLUCOSA PLASMATICA DE RATAS DE 10 DIAS DE
EDAD INYECTADAS CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS ± E.S.M)

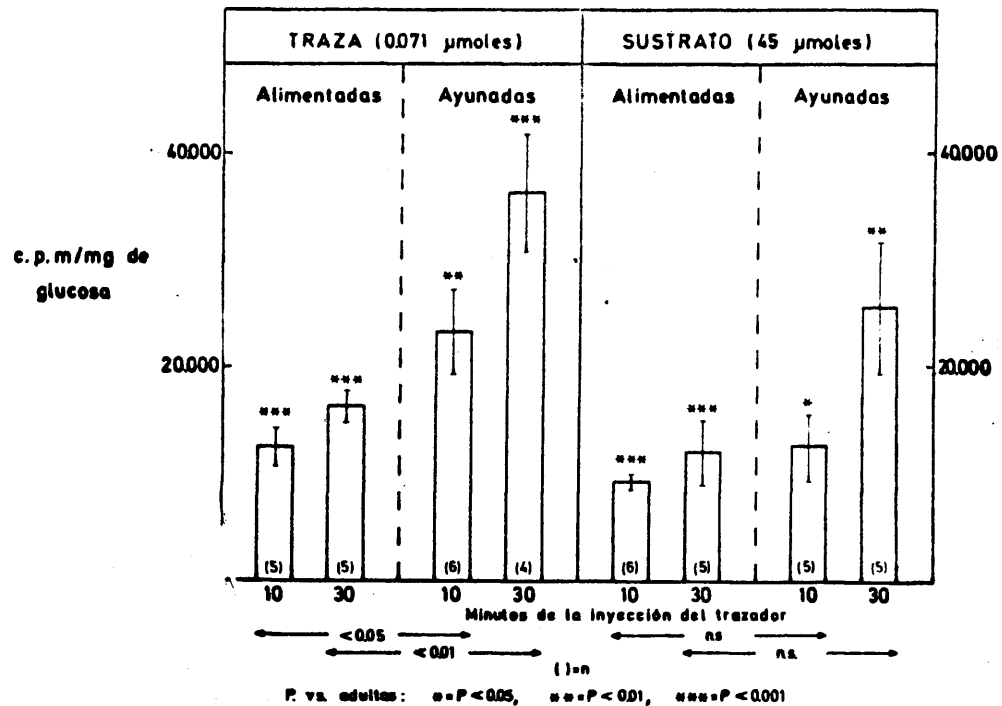
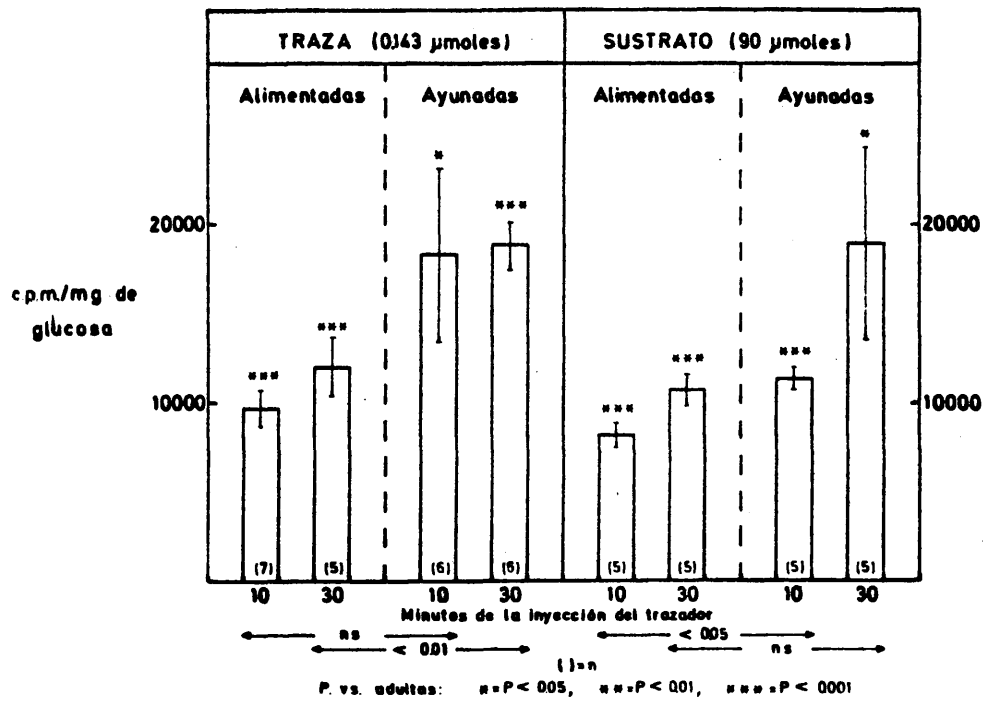
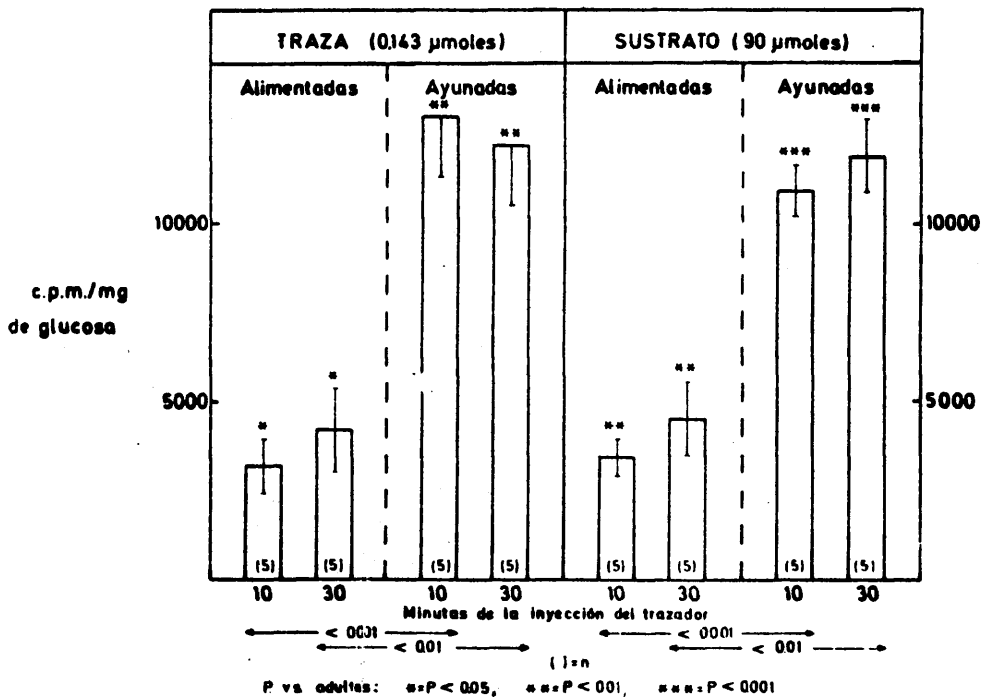


FIG.46

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA GLUCOSA PLASMATICA DE RATAS DE 20 DIAS DE
EDAD INYECTADAS CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS ± E.S.M)



ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA GLUCOSA PLASMATICA DE RATAS DE 30 DIAS
DE EDAD INYECTADAS CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS ± E.S.M)



ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA GLUCOSA PLASMATICA DE RATAS ADULTAS
INYECTADAS CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

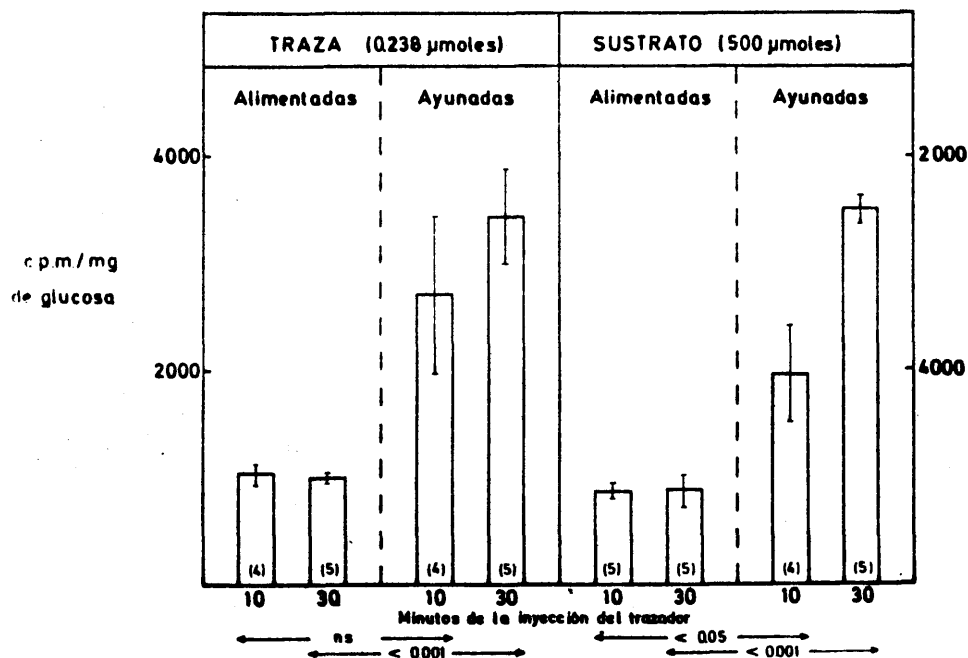
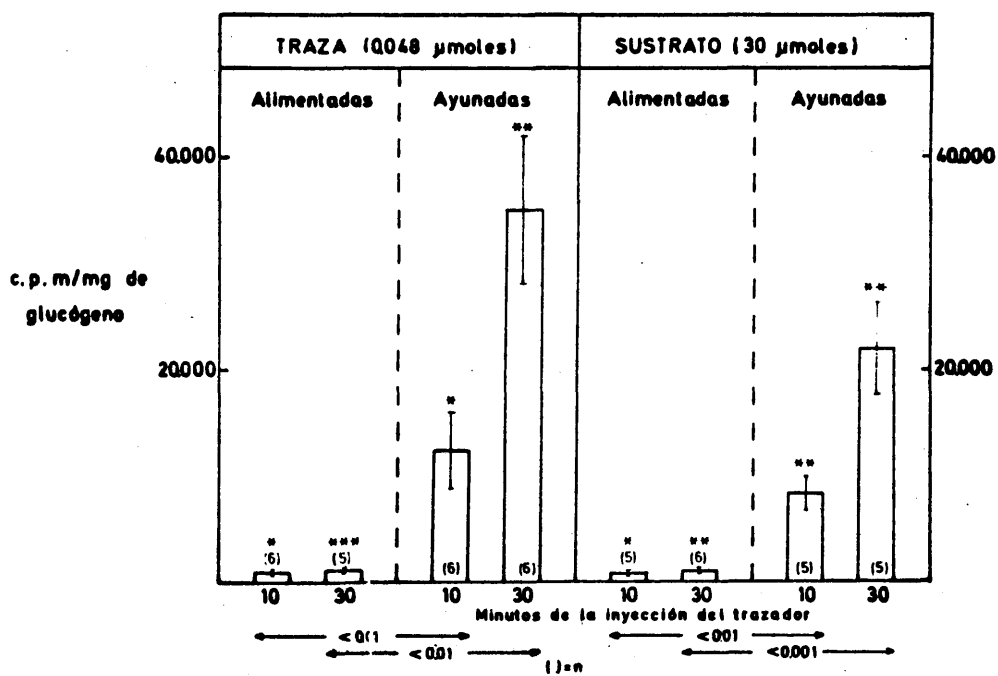


FIG. 49

ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL GLUCOGENO HEPATICO DE RATAS DE 5 DIAS DE
EDAD CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)



P. vs adultas: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

FIG. 50

ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL GLUCOGENO HEPATICO DE RATAS DE 10 DIAS DE
INYECTADAS CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±ESM)

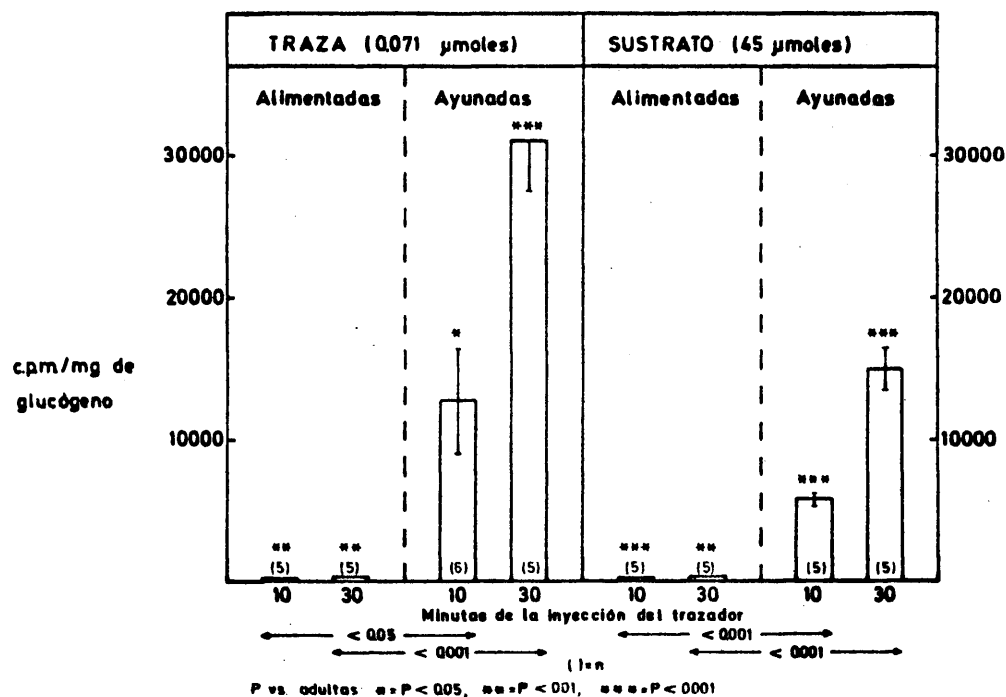


FIG. 51

ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL GLUCOGENO HEPATICO DE RATAS DE 20 DIAS DE
EDAD INYECTADAS CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

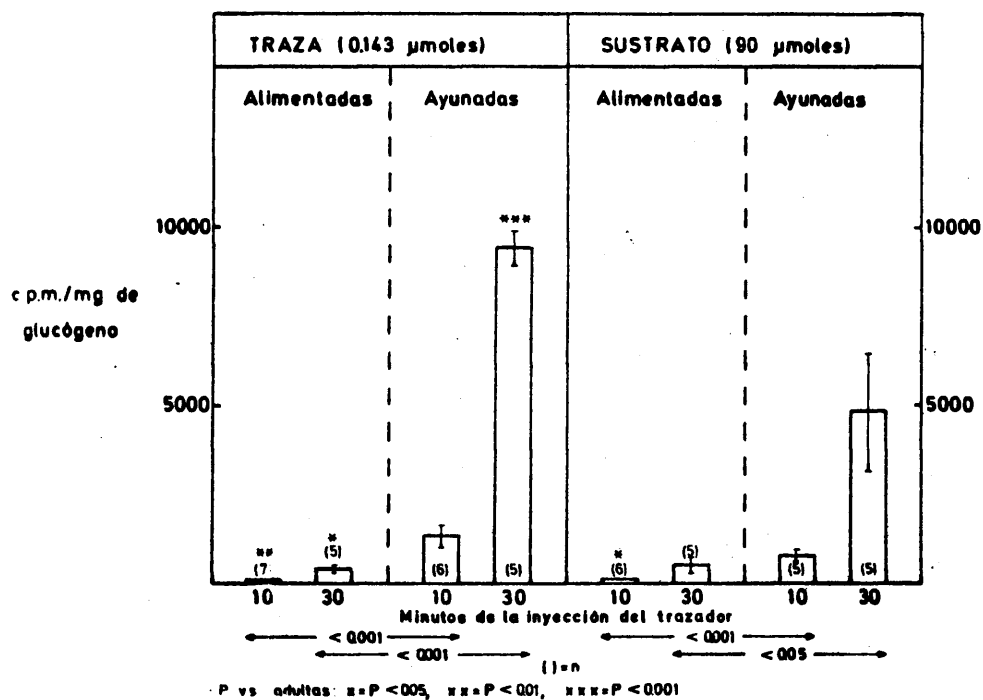


FIG. 52

ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL GLUCOGENO HEPATICO DE RATAS DE 30 DIAS DE EDAD
INYECTADAS CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

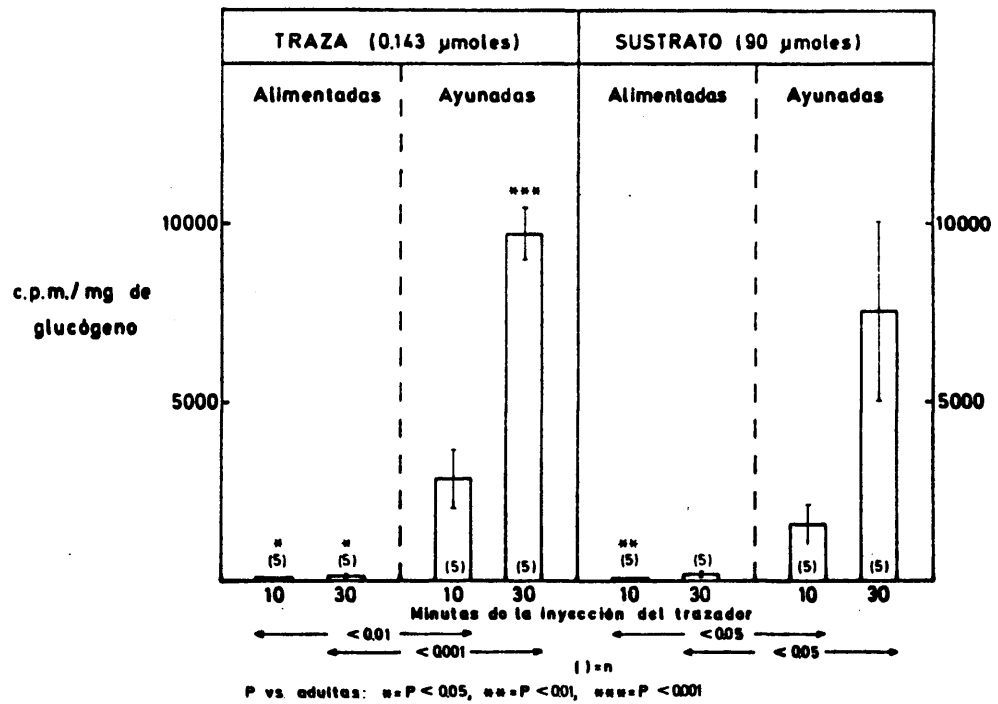


FIG 53

ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL GLUCOGENO HEPATICO DE RATAS ADULTAS INYECTADAS
CON Ac. PIRUVICO-3-C¹⁴ (MEDIAS±E.S.M)

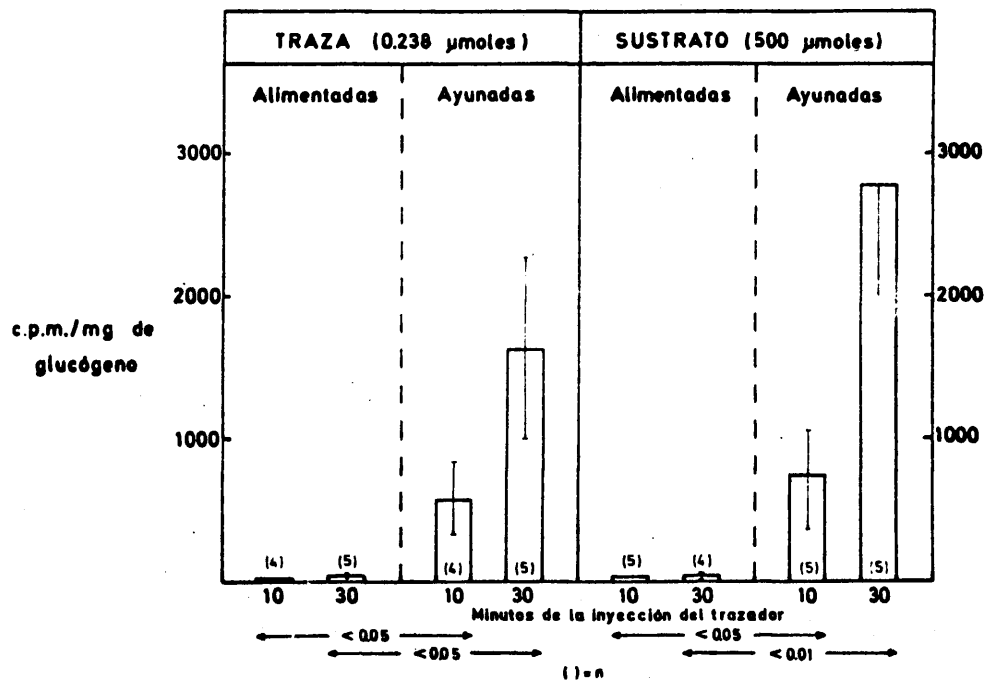


FIG 54

grupos de animales jóvenes con respecto a los adultos, tanto alimentados como en ayunas y condiciones traza o sustrato.

Al igual que ocurre con la actividad específica de la glucosa en sangre, la actividad específica del glucógeno hepático es máxima en los animales de 5 días y va disminuyendo con la edad, (fig.50 a 54). El ayuno produce un gran aumento de este parámetro en todos los grupos como se ha demostrado en otras condiciones experimentales (Herrera y Col., 1969).

7- LIPOGENESIS "IN VIVO"

Con la finalidad de relacionar los resultados de la gluconeogénesis con la formación de lípidos en los animales de distintas edades, en el mismo experimento descrito en el apartado anterior, hemos determinado la radiactividad incorporada a lípidos totales- C^{14} e identificado la que se encuentra en forma de glicerol de los glicéridos.

La formación de lípidos totales hepáticos es superior, en general, en las ratas lactantes que en las adultas (fig.55 a 59).

Es interesante considerar la distribución de la radiactividad en los lípidos de los distintos grupos. En los animales lactantes alimentados el glicerol de los glicéridos constituye la mayor parte de la radiactividad total de los lípidos hepáticos (tabla 2): más de un 94% en los de 5 días, del 95% en los de 10 días y del 97% en los de 20 días; mientras que en los controles adultos este por

T A B L A 2

Formación de glicerol de glicéridos- C^{14} a partir de piruvato- C^{14} en ratas lactantes y adultas (Ad).

	<u>Traza</u>		<u>Sustrato</u>	
	10 min.	30 min.	10 min.	30 min.
Ad.				
Al.	.004 \pm .001, 23%	.005 \pm .001, 25%	.002 \pm .001, 48%	.006 \pm .001, 51%
ay.	.010 \pm .003, 100% NS	.025 \pm .005, 96% p<.01	.005 \pm .003, 77% NS	.020 \pm .002, 98% p<.001
5días				
Al.	.031 \pm .004, 94% **	.137 \pm .045, 99% *	.019 \pm .003, 95% ***	.054 \pm .006, 95% ***
Ay.	.050 \pm .003, 96% NS	.259 \pm .089, 99% NS	.019 \pm .003, 91% NS	.070 \pm .014, 98% NS
10días				
Al.	.029 \pm .003, 100% ***	.063 \pm .007, 95% ***	.015 \pm .002, 100% ***	.059 \pm .021, 100% *
Ay.	.098 \pm .042, 98% NS	.047 \pm .011, 100% NS	.011 \pm .003, 92% NS	.057 \pm .002, 100% NS
20días				
Al.	.029 \pm .010, 97% *	.050 \pm .002, 98% ***	.021, 100%	.039 \pm .002, 100% ***
Ay.	.054 \pm .015, 100% NS	.088 \pm .012, 98% ** p<.05	.047, 100%	.043, 97%
30días				
Al.	.009 \pm .006, 82%	.026 \pm .005, 95% **	.008 \pm .003, 73%	.029 \pm .009, 70% *
Ay.	.031 \pm .008, 100% p<.05	.074 \pm .012, 98% ** p<.01	.024 \pm .006, 96% p<.05	.053 \pm .010, 98% NS

p indica la significatividad entre las ratas alimentadas y ayunadas. Los asteriscos indican la significatividad frente a las ratas adultas (* = p<.05, ** = p<.01, *** = p<.001).

El porcentaje que aparece al lado de cada resultado indica el % de la radiactividad de los lípidos totales que está en la fracción del glicerol de los glicéridos.

FORMACION DE LIPIDOS- C^{14} EN HIGADO A PARTIR DE Ac. PIRUVICO-3- C^{14} EN RATAS DE 5 DIAS DE EDAD (MEDIAS \pm E.S.M)

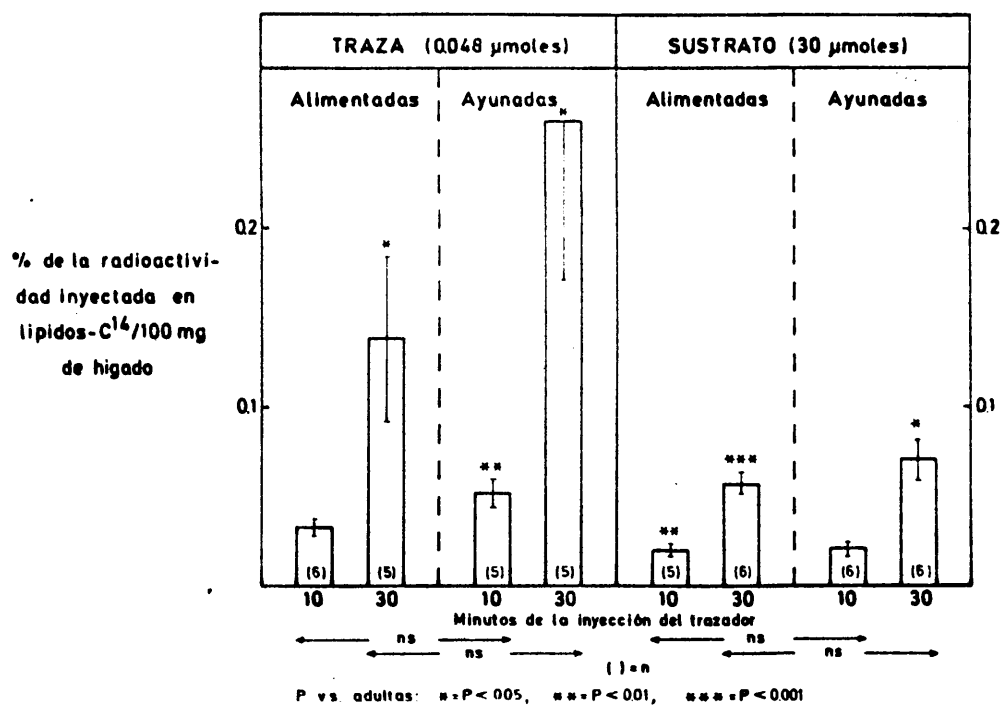


FIG.55

FORMACION DE LIPIDOS- C^{14} EN HIGADO A PARTIR DE Ac. PIRUVICO-3- C^{14} EN RATAS DE 10 DIAS DE EDAD (MEDIAS \pm E.S.M)

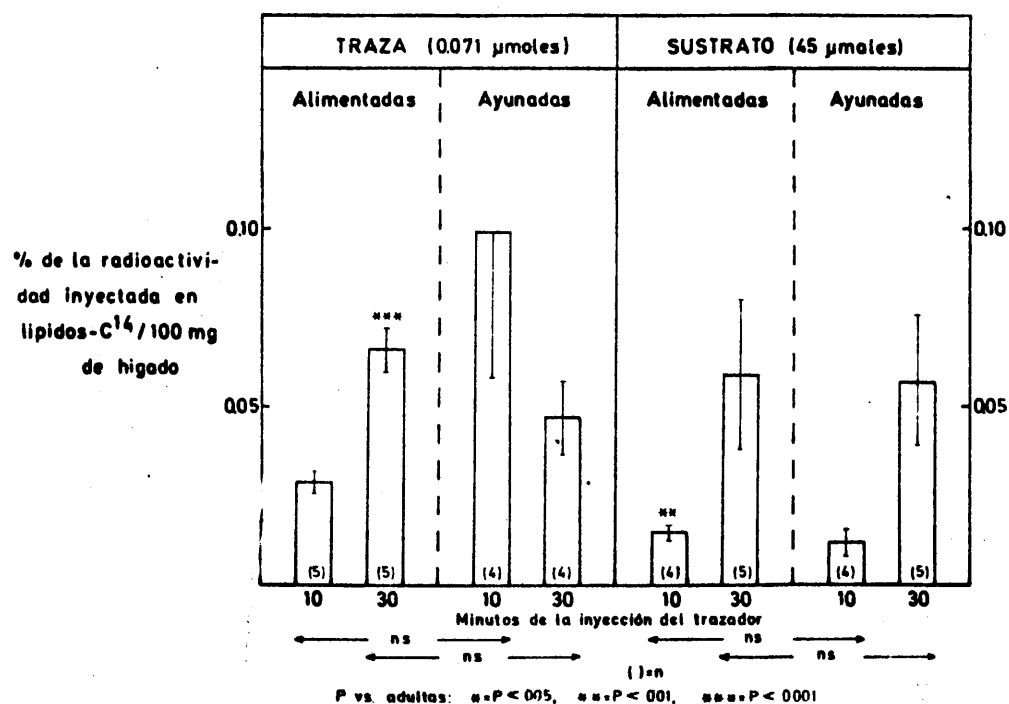


FIG.56

FORMACION DE LIPIDOS- C^{14} EN HIGADO A PARTIR DE Ac. PIRUVICO-3- C^{14} EN
RATAS DE 20 DIAS DE EDAD (MEDIAS \pm E.S.M)

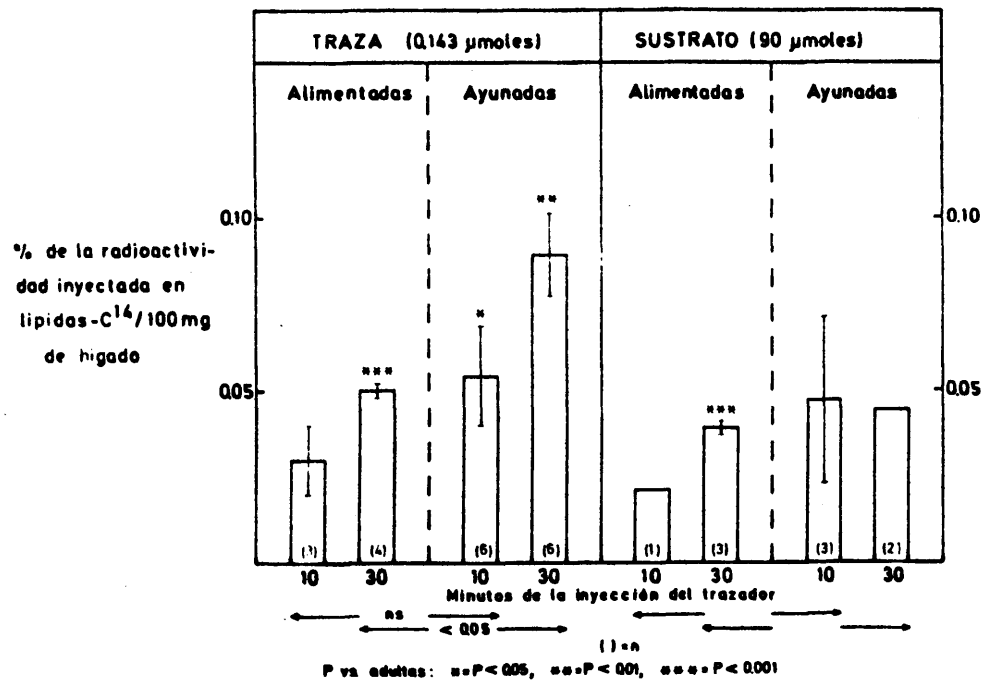


FIG. 57

FORMACION DE LIPIDOS- C^{14} EN HIGADO A PARTIR DE Ac. PIRUVICO-3- C^{14} EN
RATAS DE 30 DIAS DE EDAD (MEDIA \pm E.S.M)

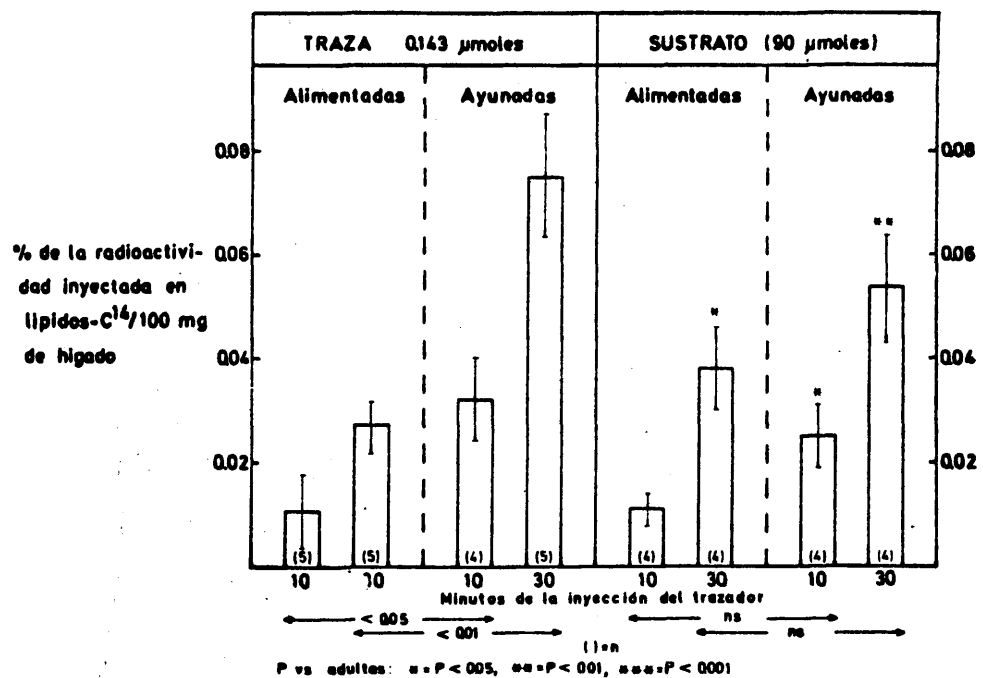


FIG. 58

centaje es mucho más bajo (menos del 51%, fig.60). En las ratas de 30 días encontramos una situación intermedia (del 70 al 95%).

En los animales lactantes ayunados continúa apareciendo la casi totalidad de la radiactividad de los lípidos en la fracción del glicerol de los glicéridos (más de un 91% en todos los casos), como sucedía cuando estaban alimentados. En los adultos este porcentaje aumenta mucho tras el ayuno (80-100% de la radiactividad), obteniéndose valores próximos a los que aparecen en las ratas jóvenes.

Se puede apreciar el paralelismo que existe entre estos resultados y los de la gluconeogénesis presentados anteriormente, lo que en confirmación de estudios realizados "in vitro", demuestra que cuando existe una gran actividad gluconeogénica se presenta una formación aumentada de glicerol de glicéridos con respecto a la de lípidos totales y viceversa, lo que confirma la relación inversa que existe entre lipogénesis y gluconeogénesis. En nuestros animales vemos esto precisamente, ya que los lactantes que tienen una gluconeogénesis aumentada con respecto a los adultos forman mayor proporción de glicerol de los glicéridos que estos últimos, que además aumentan este parámetro junto con la gluconeogénesis tras el ayuno.

B- ESTADO TIROIDEO Y METABOLISMO INTERMEDIARIO

Como hemos indicado anteriormente (secc. III-B de Materiales y Métodos), varios grupos de animales fueron ti-

roidectomizados e inyectados con distintas cantidades de tiroxina exógena. Hasta el día del sacrificio (45-61 días después de la tiroidectomía) fueron alimentados con una dieta de bajo contenido en iodo. Otro grupo de animales intactos recibieron la misma dieta pero suplementada con iodato y fueron considerados como controles.

El estudio se hizo en animales alimentados y tras un ayuno de 48 horas.

1- NIVELES PLASMATICOS DE PBI Y HORMONA TIROTROPA

Las ratas tiroidectomizadas que no fueron inyectadas con T_4 muestran unos niveles muy bajos de iodo ligado a proteínas (PBI) ($0.3 \mu\text{g/ml}$), cuando se comparan con los controles (tabla 3).

La inyección diaria de $0.1 \mu\text{g}$ de tiroxina/100 g de peso hace que el PBI aumente al doble, a pesar de lo cual este parámetro continúa siendo más bajo que en los controles.

Cuando las ratas tiroidectomizadas son inyectadas diariamente con $2 \mu\text{g}$ de T_4 /100 g. de peso el PBI se eleva, siendo del mismo rango que en los animales controles. La inyección de $25 \mu\text{g}$ de T_4 a las ratas tiroidectomizadas produce una gran elevación en el PBI plasmático que alcanza un valor de algo más del doble del de los animales controles.

Como se puede observar en la tabla 3 tras un ayuno de 48 horas varían algo los valores absolutos de PBI pero se puede seguir considerando que los grupos T+0 y T+0.1 tienen unos valores muy bajos de hormonas tiroideas cir

FORMACION DE LIPIDOS- C^{14} EN HIGADO A PARTIR DE Ac. PIRUVICO-3- C^{14} EN RATAS ADULTAS (MEDIAS \pm E.S.M)

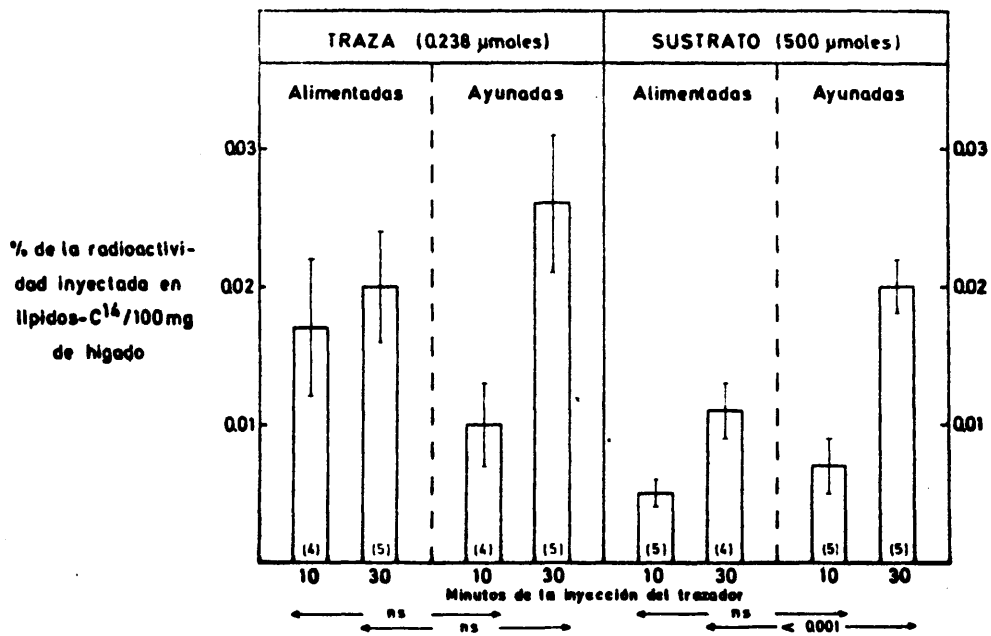


FIG. 59

FORMACION DE GLICEROL DE GLICERIDOS- C^{14} EN HIGADO A PARTIR DE Ac. PIRUVICO-3- C^{14} (MEDIAS \pm E.S.M)

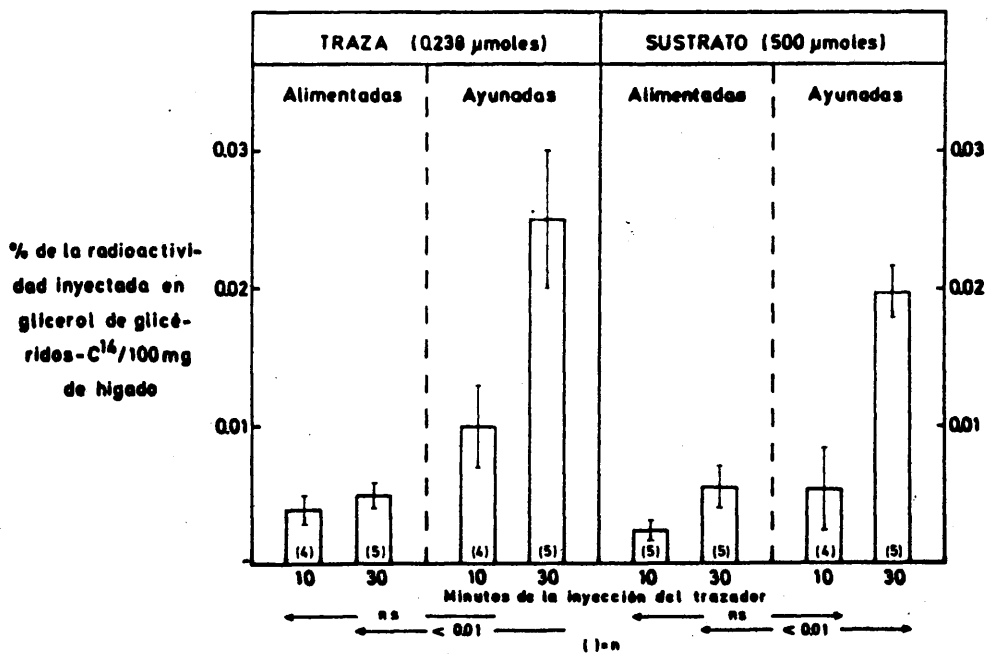


FIG. 60

T A B L A 3

Niveles plasmáticos de PBI y TSH en ratas tiroidectomizadas y tratadas con distintas dosis de T_4

	<u>PBI</u>		<u>TSH</u>
	$\mu\text{g}/100\text{ml}$		$\mu\text{U}/\text{ml}$
	Al.	Ay.	
C	6.9	3.2	91
T+0	0.3	0.4	2979
T+0.1	0.6	1.1	2979
T+2	5.9	6.7	240
T+25	13.4	15.6	48

culantes, las T+2 pueden considerarse dentro de los límites normales y las T+25 tienen un PBI muy alto. En el efecto del ayuno llama la atención que en los animales controles disminuye el PBI mientras que en el resto de los grupos hay un pequeño aumento. Esto probablemente se debe a que en estos grupos se mantiene la inyección de T_4 durante los dos días de ayuno y sin embargo en las ratas controles se elimina la única vía por la que el yodo llega al animal: la comida.

En este parámetro no presentamos cálculos estadísticos ya que las valoraciones se hicieron en un "pool" de los plasmas de todos los animales de cada grupo.

Con el fin de confirmar el estado tiroideo de nuestros animales se examinó un parámetro muy sensible a un aumento o disminución de las hormonas tiroideas: el TSH.

El TSH fue valorado por la doctora M. D. García de la sección de Estudios Tiroideos del Inst. G. Marañón, por el método de García y Morreale (1970) montado en ese laboratorio. Como en el caso del PBI, las valoraciones fueron hechas en un "pool", por lo que no es posible hacer un cálculo estadístico. Sin embargo se puede ver claramente (tabla 3) que, como era de esperar, los animales T+0 y T+0.1 presentan una gran elevación del TSH circulante (2979 unidades frente a 91 unidades de los controles). Estas unidades representan la millonésima parte del TSH valorable en una hipófisis de rata normal adulta.

En los animales tratados con $2 \mu\text{g}$ de T_4 los niveles de TSH plasmático son bastante similares a los que

presentan los controles, lo que está de acuerdo con los niveles normales de PBI en ese grupo.

En los animales tratados con 25 μ g de T_4 , esta dosis de tiroxina ha sido capaz de frenar la hipófisis ya que los niveles de TSH son más bajos que en los animales controles.

2- NIVELES DE HORMONA DE CRECIMIENTO HIPOFISARIA Y PESO CORPORAL

Los resultados de hormona de crecimiento se presentan como la relación GH/albúmina de la densitometría de las bandas que aparecen en la electroforesis en gel de poli-acrilamida. Esto se hace para evitar errores ya que, debido al distinto tamaño de las hipófisis, la cantidad de proteínas ensayadas en el gel puede variar. De esta forma la banda de hormona de crecimiento se refiere a otra en la que el estado tiroideo no influye.

Los animales tiroidectomizados inyectados con salino presentan un contenido de GH en hipófisis significativamente menor que los animales controles ($p < 0.05$) (tabla 4)

La dosis de 0.1 μ g de T_4 no ha sido capaz de revertir este fenómeno ya que el contenido hipofisario en hormona de crecimiento continúa muy bajo, habiendo una diferencia significativa con respecto a los animales del grupo control.

Los animales tiroidectomizados e inyectados con 2 μ g de T_4 presentan un contenido hipofisario en GH similar al del grupo control, habiendo sido capaz esa dosis de

restablecer la normalidad también en este parámetro.

Los animales tratados con 25 μ g de tiroxina tampoco difieren de los controles en cuanto al contenido hipofisario de hormona de crecimiento. .

Lógicamente estos datos deben relacionarse con el peso de los animales (tabla 4). Aunque al comenzar el experimento no había diferencia en el peso de los animales de los distintos grupos, al tiempo del sacrificio los animales tiroidectomizados no tratados con tiroxina pesaban solamente 97 g frente a los 237 g de los controles ($p < 0.001$). Esta diferencia de peso se debe a que su crecimiento ha sido menor ya que son claramente más pequeños. Este fenómeno ha sido observado anteriormente en numerosas ocasiones (Mehanahan y Wieland, 1969; Malaisse y Col., 1967) y debe estar estrechamente relacionado con la disponibilidad de hormona de crecimiento (Griesbach y Purves, 1945), que como hemos visto está muy disminuida en estos animales.

El tratamiento con 0.1 μ g de T_4 restaura en parte la capacidad de crecimiento de estos animales, aunque todavía el peso es bastante inferior al de los animales intactos (163 g frente a 237 g, $p < 0.001$). Es interesante destacar que, a pesar de no existir diferencias en la GH hipofisaria entre los grupos T+0 y T+0.1, sus pesos corporales difieren considerablemente, indicando que la cantidad de hormona de crecimiento circulante en este último grupo debe ser superior a la del grupo T+0, a pesar de que en la hipófisis no se aprecien diferencias.

T A B L A 4

Contenido hipofisario de GH y peso corporal de ratas tiroidectomizadas y tratadas con distintas dosis de T_4

	<u>GH</u> GH/albúmina		<u>peso corporal</u> gramos	
C	4.08±0.29		237±11	
T+0	2.47±0.38	p<.05	97±6	p<.001
T+0.1	2.41±0.16	p<.01	163±8	p<.001
T+2	4.32±0.49	NS	244±21	NS
T+25	3.55±0.22	NS	192±9	p<.01

p indica la significatividad frente a los animales controles (C)

La administración de 2 μ g de tiroxina exógena normaliza totalmente el peso corporal de los animales.

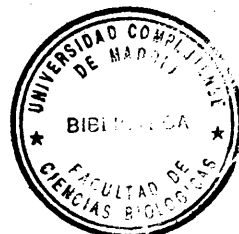
Cuando los animales se tratan con 25 μ g de T_4 , el peso es menor que en los animales controles ($p < 0.01$). Esto no es debido a una disminución del crecimiento, ya que la hormona de crecimiento en la hipófisis es normal y la longitud de las ratas era similar a la de las controles, sino a que los animales eran más delgados debido a la situación de gran catabolismo que se presenta en el hipertiroidismo (Freinkel y Metzger, 1971)

3- PESO, CELULARIDAD Y COMPOSICION DEL HIGADO

Lo mismo que sucedía con el peso del cuerpo, el peso del hígado es menor en los animales tiroidectomizados tratados con 0 ó 0.1 μ g de T_4 que en los controles. El peso del hígado se iguala a los controles cuando los animales tiroidectomizados están tratados con 2 o 25 μ g de tiroxina (fig.61)

Tras el ayuno los hígados de todos los animales disminuyen ($p < 0.001$), pero esta disminución es máxima en el grupo T+0 y mínima en el T+25, de tal forma que en este último grupo el hígado llega a ser aún mayor que en los controles ($p < 0.05$).

Manejando animales de tamaño tan distinto, pensamos que es más demostrativo ver el peso relativo del hígado y para ello calculamos el peso del hígado/100 g de peso corporal (fig.62). Esta relación sigue siendo significativamente menor en los grupos T+0 y T+0.1. El grupo T+2



continúa sin variación con respecto a los animales controles y los animales tiroidectomizados tratados con $25 \mu\text{g}$ de T_4 tienen proporcionalmente mayor el hígado, cuando están alimentados, que los controles ($p < 0,05$) y esta diferencia se acentúa aún más tras las 48 hr. de ayuno ($p < 0.001$).

Debido al distinto peso de los hígados consideramos interesante estudiar su celularidad. Como índice de celularidad utilizamos el fósforo de DNA.

Cuando calculamos el P-DNA/g. de hígado vemos que no hay diferencias entre ninguno de los grupos cuando los animales están alimentados (fig.63). Esto nos indica que, en esta situación, el tamaño de las células es el mismo en todos los grupos y las diferencias en el peso hepático han de deberse al diferente número (y no tamaño) de las células.

Tras 48 horas de ayuno el DNA calculado por gramo de hígado aumenta en todos los grupos, como era de esperar, debido a la disminución del tamaño celular. El mayor aumento se produce en el grupo T+0 ($p < 0.02$ respecto a los controles) y esto podría ser explicado por ser el grupo que presenta mayor disminución del peso de hígado con el ayuno.

Si calculamos el DNA/hígado total no hay diferencia entre los grupos alimentados y sus correspondientes ayunados, como ocurre en otras ocasiones (Herrera y Freinkel, 1968; Herrera y Col., 1969). Esto significa que después del ayuno hay el mismo número de células en el hígado y la disminución de peso de este órgano se deberá solamente a la disminución del tamaño celular.

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENO SOBRE EL PESO DEL HIGADO EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

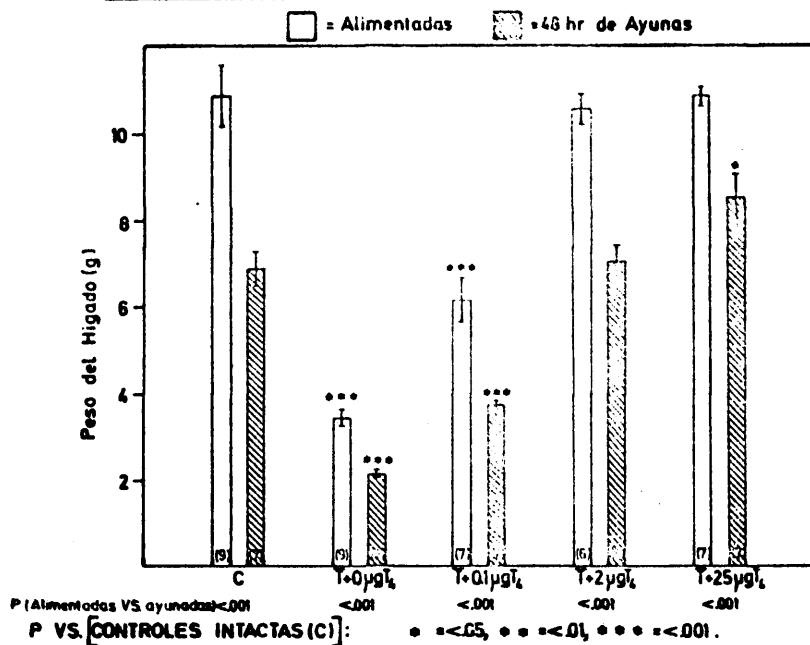


FIG. 61

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA SOBRE EL PESO DEL HIGADO/100g DE PESO CORPORAL EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

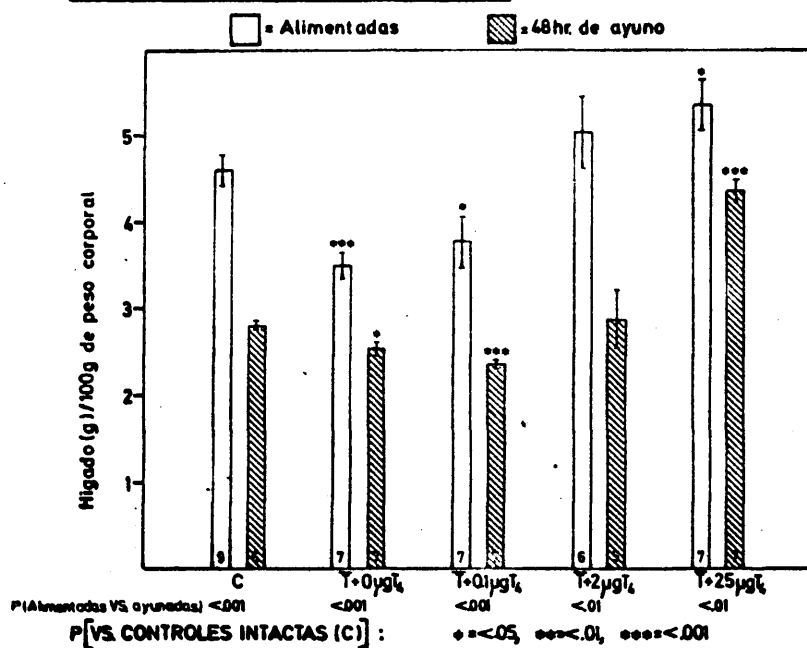


FIG. 62

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA
SO EL FOSFORO DE DNA HEPATICO EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

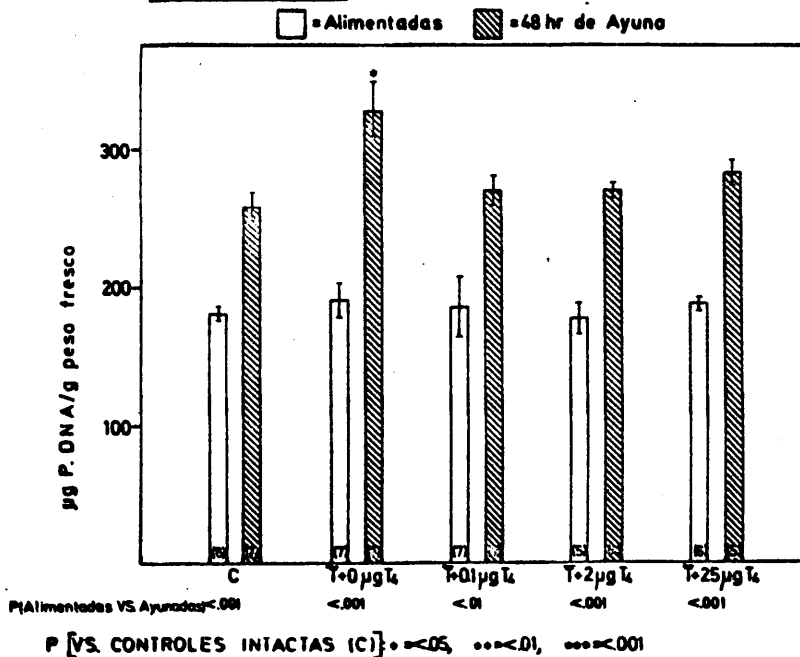


FIG 63

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA SOBRE EL
FOSFORO DE FOSFOLIPIDOS HEPATICO EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

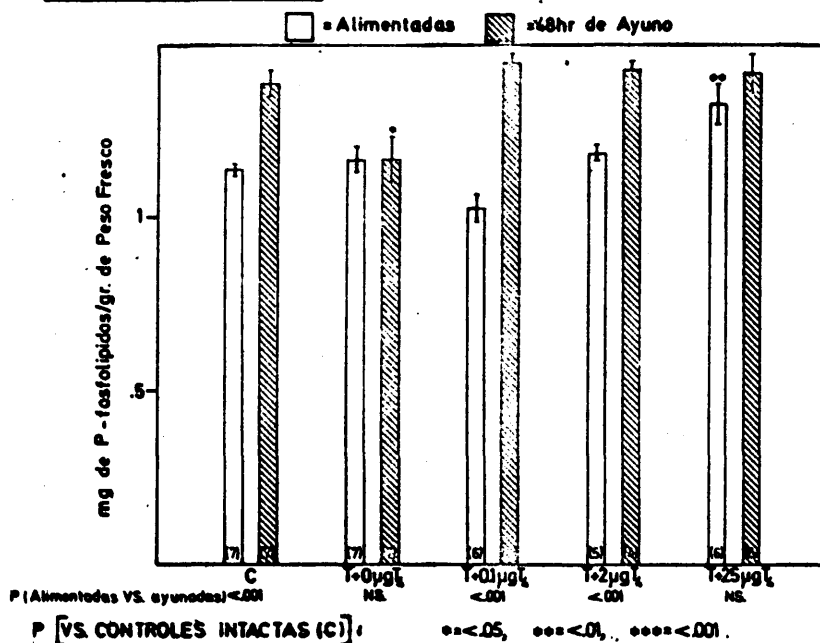


FIG 64

El fósforo de fosfolípidos calculado por gramo de hígado es igual en los animales tiroidectomizados tratados con 0, 0.1 y 2 μ g de T_4 que en los controles (fig.64), mientras que es más alto ($p < 0.01$) en los tratados con 25 μ g de T_4 . Después del ayuno de 48 hr. aumenta este parámetro en los animales controles y en los tratados con 0.1 y 2 μ g de T_4 , mientras que permanece igual en los tratados con 0 y 25 μ g de T_4 . Teniendo en cuenta que la máxima pérdida de peso del hígado tras el ayuno corresponde al grupo T+0, en este grupo hay también la mayor disminución de fosfolípidos con el ayuno (cuando éstos se calculan por hígado total), lo cual está de acuerdo con una máxima disminución del tamaño de las células hepáticas con el ayuno en estos animales.

La concentración de proteínas hepáticas/g (fig. 65), cuando los animales están alimentados, es igual en todos los grupos excepto en las T+0 en que es más alta ($p < 0.02$). Con el ayuno se produce un incremento en este parámetro excepto en el caso de los animales T+25, en que no varía.

Como índices generales del metabolismo de hidratos de carbono y grasas hemos estudiado la concentración de ácidos grasos totales y glucógeno en el hígado.

La concentración de ácidos grasos totales es igual en todos los grupos cuando los animales están alimentados (fig.66). En el ayuno se produce una gran elevación de este parámetro, como consecuencia de la gran movilización de grasas en ese estado, en los animales controles y en los trata-

dos con 0, 0.1 y 2 μ g de T_4 , mientras que permanecen los mismos niveles que cuando estaban alimentados en los animales tratados con 25 μ g de tiroxina.

El % de glucógeno presente en el hígado de los animales tiroidectomizados tratados con 0, 0.1 y 2 μ g de T_4 no difiere del de los animales controles (fig,67). Sin embargo, es mucho más bajo en los tratados con 25 μ g de T_4 ($p < 0.001$).

Cuando los animales se someten al ayuno los niveles de glucógeno descienden en todos los grupos, pero esta disminución es mayor en los grupos T+0 y T+0.1 que en los controles ($p < 0.02$ y $p < 0.05$ respectivamente). Los niveles de los grupos T+2 y T+25 no difieren del de los controles cuando están ayunados, debido a que la disminución del glucógeno hepático es menor en este último grupo, desapareciendo así las diferencias con los controles.

4- ESTADO ESTACIONARIO DE METABOLITOS REGULADORES EN EL HÍGADO

La concentración hepática de Ac-CoA, cuando los animales están alimentados, es igual en todos los grupos experimentales independientemente de su situación tiroidea (fig. 68). Tras las 48 hr. de ayuno la concentración de Ac-CoA aumenta en las ratas controles y en las tiroidectomizadas tratadas con 0, 0.1 y 2 μ g de T_4 , mientras que en las tratadas con 25 μ g no hay diferencia significativa con respecto a este mismo grupo cuando estaba alimentado.

La concentración de ácido cítrico, similarmente a lo que ocurría en el caso anterior, es igual en todos los

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA SOBRE LAS PROTEINAS HEPATICAS EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

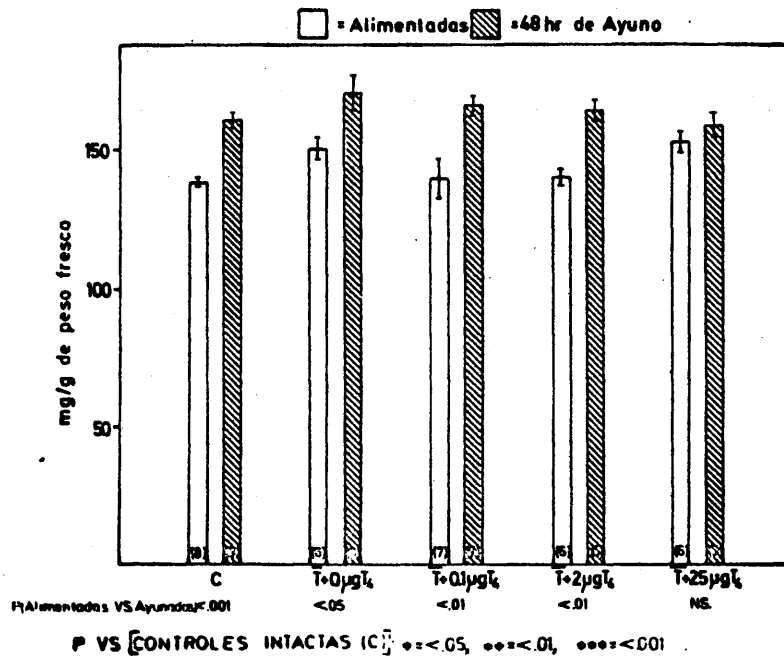


FIG 65

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA SOBRE LOS ACIDOS GRASOS TOTALES HEPATICOS EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

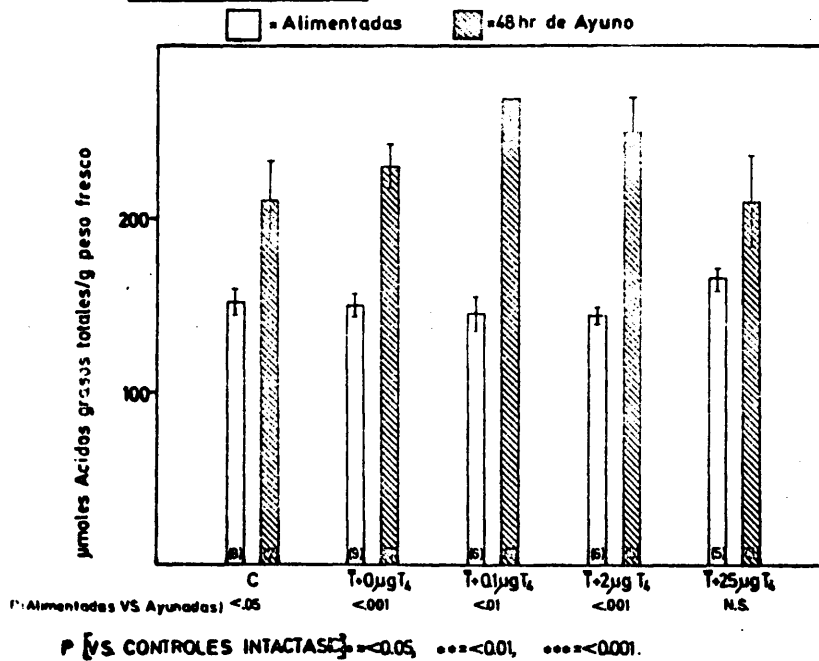


FIG 66

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA SOBRE EL GLUCOGENO HEPATICO EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

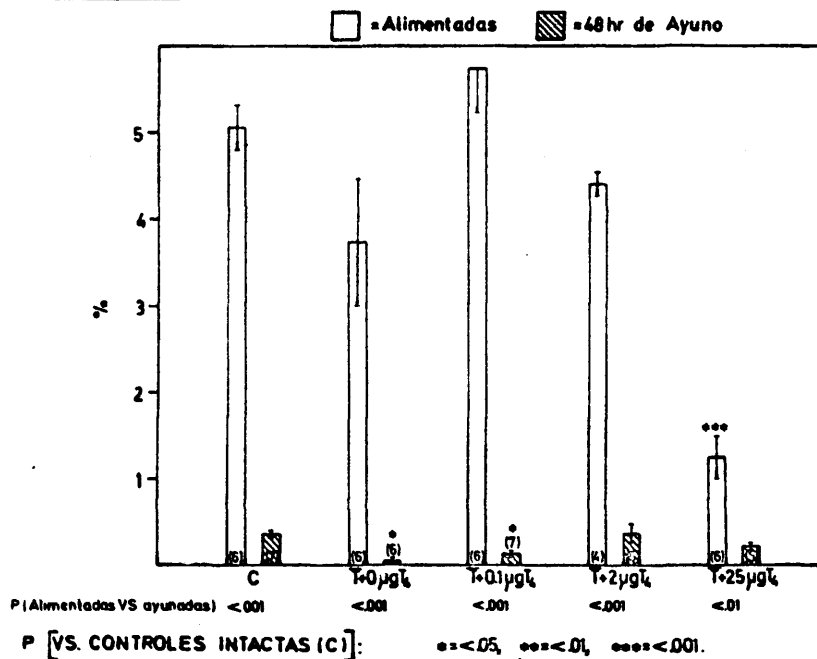


FIG. 67

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA SOBRE EL ACETIL-CoA HEPATICO EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

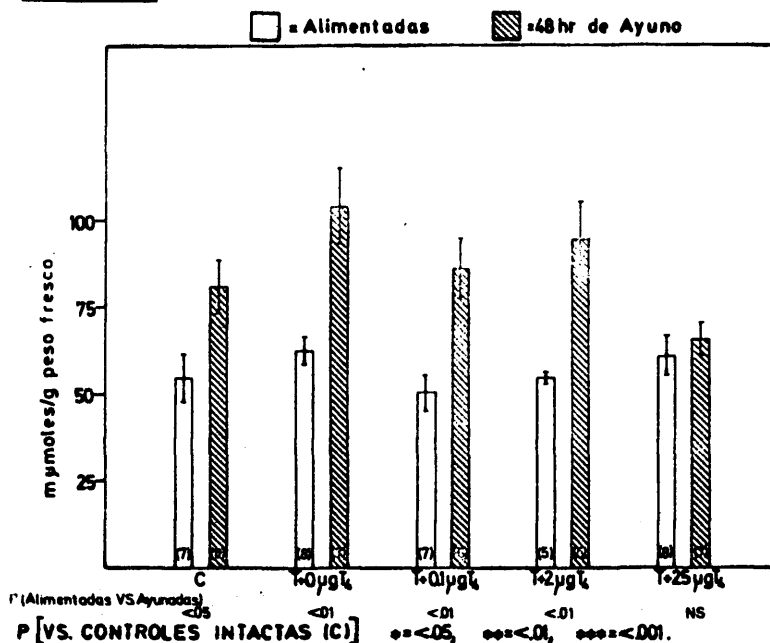


FIG. 68

grupos cuando están alimentados (fig.69). Tras el ayuno vuelven a aparecer diferencias. En las ratas controles los niveles de cítrico bajan significativamente como ya ha sido descrito anteriormente (Herrera y Freinkel, 1968), posiblemente como consecuencia de una inhibición de la citrato sintetasa y/o de una falta de OAA para acoplarse al Ac-CoA tras el ayuno. Lo mismo sucede en las ratas tiroidectomizadas tratadas con 0.1 y 2 μ g de tiroxina. Sin embargo, los niveles de citrato no varían en los animales T+0 y T+25 con respecto a cuando estaban alimentados, apareciendo diferencias significativas con respecto a las controles.

El ácido pirúvico cuando los animales están alimentados (fig.70), es igual en los grupos T+0.1 y T+25 que en los controles, más bajo en el grupo T+0 ($p < 0.001$) y más alto en el grupo T+2 ($p < 0.05$).

Tras el ayuno disminuye en los controles, como ya ha sido descrito (Williamson y Col., 1967) y lo mismo sucede en los animales tratados con 2 y 25 μ g de T_4 . Sin embargo esta disminución no se produce en los tratados con 0 y 0.1 μ g de T_4 .

El ácido láctico es igual en todos los grupos cuando están alimentados (fig.71). Cuando están ayunados hay un descenso en todos los grupos (aunque sólo es significativo en las T+25), excepto en las T+0 en que no hay variación.

Es interesante calcular la relación láctico/pirúvico ya que, como hemos dicho anteriormente, es un índice de la de NADH/NAD en el citoplasma.

Cuando los animales están alimentados esta relación es igual en todos los grupos, excepto en los animales tiroi-
dectomizados inyectados con salino en los que es más alta
($p < 0.01$ respecto a los controles), (fig.72). Con el ayuno
este parámetro tiende a aumentar en los animales controles
y T+2 mientras que no se produce variación en el resto de
los grupos, lo que indica que en este último caso no hay va-
riación en el estado redox del citoplasma.

5- NIVELES PLASMATICOS DE GLUCOSA, INSULINA Y CUERPOS CETO- NICOS

Cuando los animales están alimentados la glucosa
plasmática (fig.73) es ligeramente más baja (pero esta di-
ferencia no es significativa) en los grupos T+0 y T+0.1
con respecto a los controles; en el grupo T+2 es también
un poco más baja y en este caso la diferencia si es signi-
ficativa ($p < 0.05$). El grupo T+25 presenta unos niveles de
glucosa significativamente más altos que los controles ($p < 0.05$).

Tras 48 hr. de ayuno se produce un descenso ($p < 0.001$) en la glucosa de todos los grupos. En el grupo T+0
se observa la máxima disminución ($p < 0.001$ vs. controles);
la disminución es algo menor en el grupo T+0.1, pero toda-
vía en este caso hay diferencia con respecto a los controles
($p < 0.05$); los valores plasmáticos de glucosa tras el ayuno
son iguales en el grupo T+2 que en el grupo control y más
altos en el grupo T+25 ($p < 0.01$ frente a los controles).

Las concentraciones plasmáticas de insulina en

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA SOBRE
EL ACIDO CITRICO HEPATICO EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

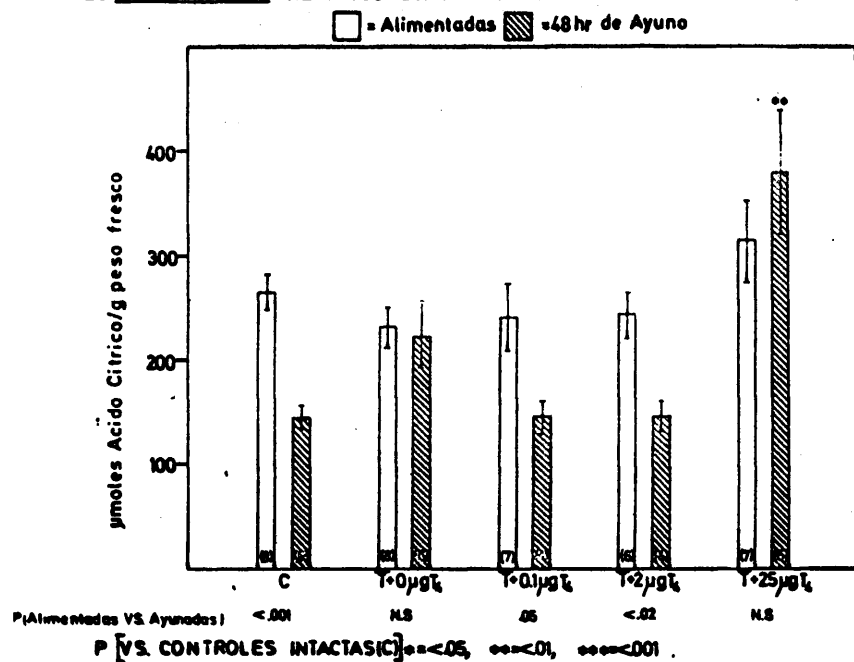


FIG. 69

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA
SOBRE EL ACIDO PIRUVICO HEPATICO EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

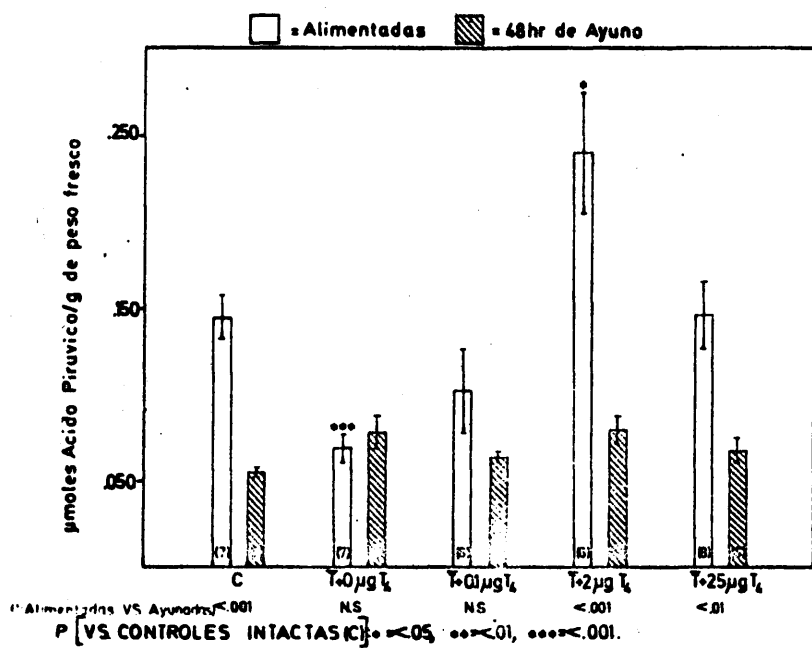


FIG. 70

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA SOBRE EL ACIDO LACTICO HEPATICO EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

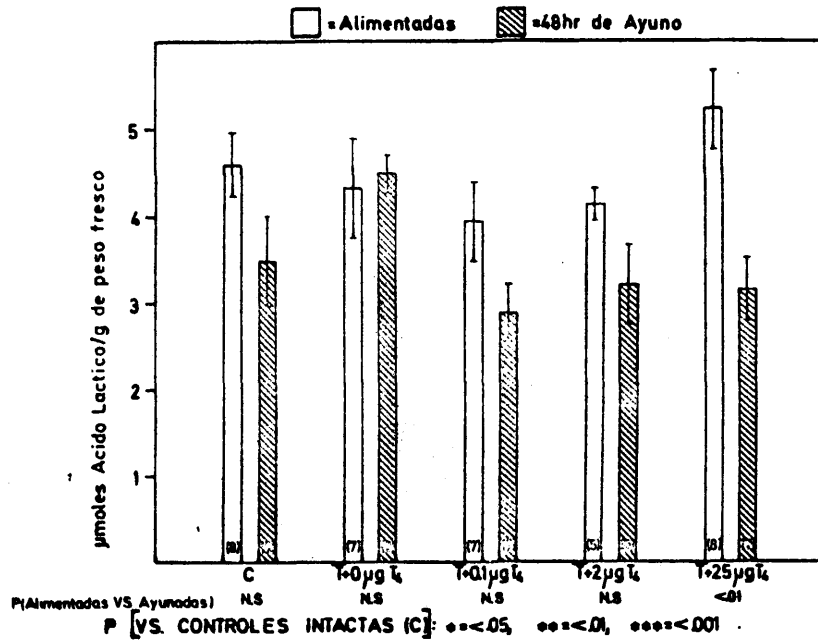


FIG.71

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA SOBRE LA RELACION LACTATO/PIRUVATO HEPATICA EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

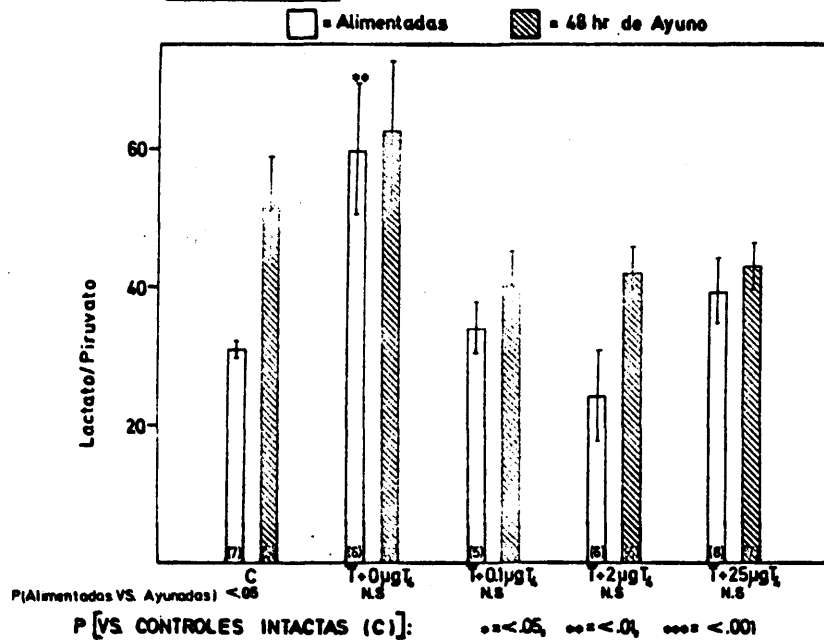


FIG.72

las ratas tiroidectomizadas y tratadas con 0 y 0.1 μg de tiroxina, son más bajos que en los animales controles ($p < 0.02$), cuando están alimentados (fig.73), lo que confirma los resultados obtenidos por Malaisse y Col (1967) en animales hipotiroideos. En los animales tratados con 2 μg de T_4 los valores de insulina son más altos que en los controles ($p < 0.05$) y esta diferencia es aún mayor en los animales hipertiroideos tratados con 25 μg de tiroxina ($p < 0.01$), a pesar de que por los datos en la literatura cabría esperar lo contrario, lo cual será comentado en la discusión.

Tras las 48 horas de ayuno los niveles plasmáticos de insulina disminuyen, como cabría esperar, en los animales controles. Lo mismo sucede en los grupos T+0.1 y T+2, en los que los valores de insulina en el ayuno no difieren de los del grupo control. Sin embargo en los animales tiroidectomizados sin T_4 o tratados con 25 μg de T_4 , la bajada de insulina con el ayuno no es significativa presentándose diferencias con las controles en las mismas condiciones, en el grupo T+0 la insulina plasmática es más baja ($p < 0.05$) y en el T+25 más alta ($p < 0.01$) que en el grupo control.

Los niveles de cuerpos cetónicos en plasma (fig. 74), cuando los animales están alimentados, son muy similares en todos los grupos. Aunque las valoraciones, en este caso, se han efectuado en un "pool" de plasmas de cada grupo y por tanto no podemos realizar comparaciones estadísticas, no parece que exista ninguna diferencia apreciable entre los grupos.

El ayuno produce un incremento en los niveles circulantes de cuerpos cetónicos en todos los grupos. Este aumento es máximo en los animales T+0, siendo la diferencia con los controles estadísticamente significativa ($p < 0.05$). El incremento va disminuyendo progresivamente, siendo mínimo en el grupo T+25.

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA SOBRE LA GLUCOSA E INSULINA PLASMATICAS EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

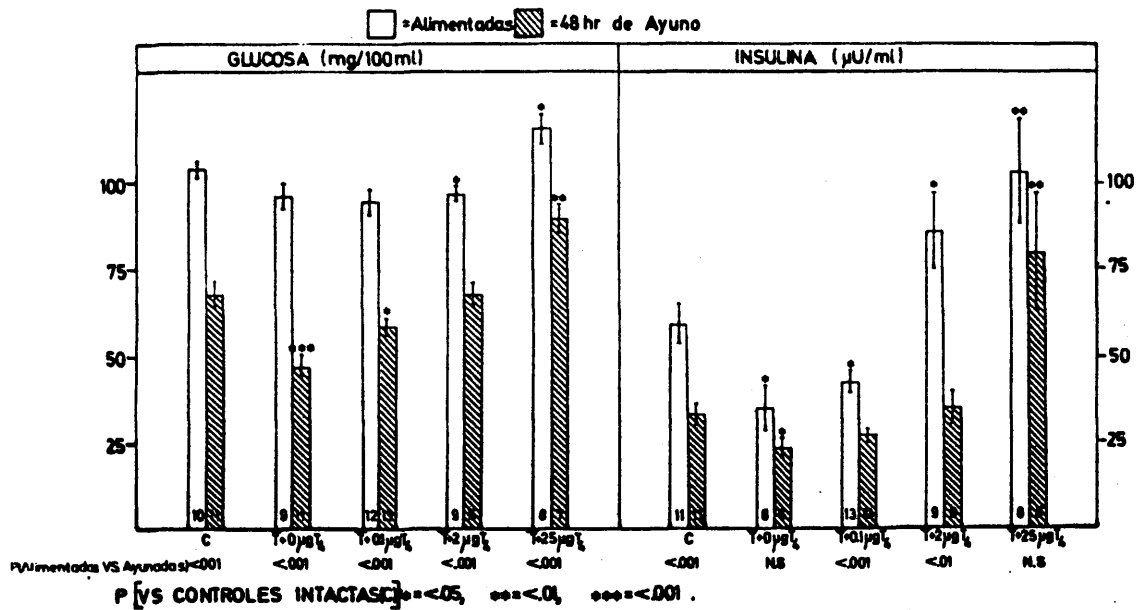


FIG.73

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA (T) Y TRATAMIENTO CON L-T₄ EXOGENA SOBRE LOS CUERPOS CETONICOS PLASMATICOS EN RATAS ALIMENTADAS Y AYUNADAS

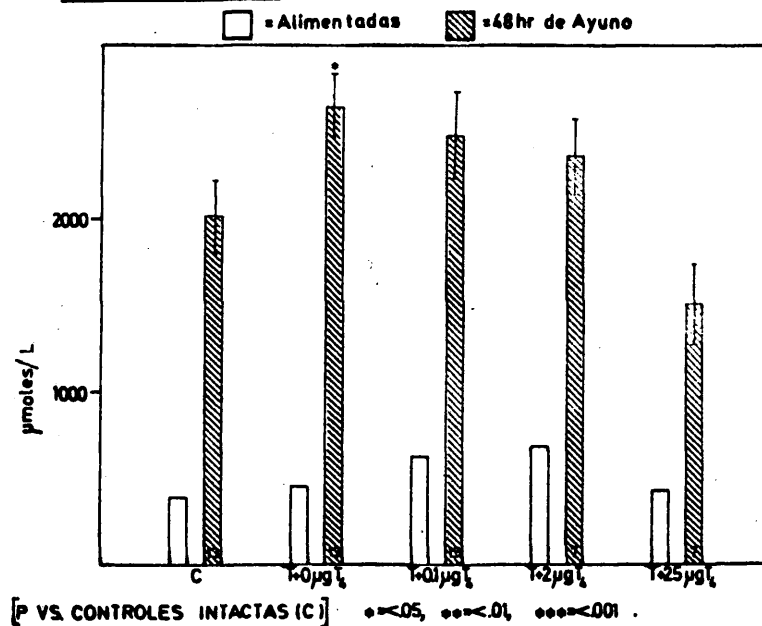


FIG.74

DISCUSSION

CONSIDERACIONES GENERALES

En la presente tesis hemos pretendido estudiar los mecanismos de regulación de las interrelaciones hidratos de carbono/grasas. Para llevar a cabo este trabajo hemos escogido situaciones experimentales en las que era conocido que dichas interrelaciones estaban alteradas, tales como la lactancia y el hipo e hipertiroidismo.

El estudio se ha realizado en las condiciones que más se acercan a la situación "in vivo", con la finalidad de conocer los mencionados mecanismos, no a nivel de enzimas aisladas, sino integrados dentro de la célula, dentro de los órganos e incluso del animal completo.

Hemos dedicado especial atención al estudio de las alteraciones metabólicas del hígado, como lugar principal del metabolismo intermediario, relacionándolo con parámetros extrahepáticos principalmente sanguíneos.

Una de las herramientas experimentales más utilizadas para realizar este tipo de estudios es el ayuno, que permite determinar la capacidad de adaptación metabólica cuando desaparecen las fuentes exógenas de energía y el animal ha de recurrir a sus propias reservas endógenas.

Aquí hemos observado que en los dos modelos experimentales estudiados se presentan grandes diferencias en el peso corporal y del hígado de los diversos grupos de animales con relación al de los correspondientes animales controles. Esto nos ha llevado a determinar distintos índices de celularidad hepática así como la composición intrínseca de dicho tejido, ya que hasta ahora estos estudios no se

habían realizado en nuestras situaciones experimentales y son necesarios para interpretar y comparar los datos de concentración por unidad de hepatocito entre los grupos.

Finalmente debido a los cambios endocrinos que se presentan en el hipo e hipertiroidismo, hemos considerado de interés el determinar los niveles de otras hormonas que "per se" afectan el metabolismo intermediario y nos ayudan a un mayor conocimiento de su regulación. En el caso de las ratas lactantes, no hemos llevado a cabo este estudio de los niveles de otras hormonas, ya que son bien conocidos los cambios endocrinos que se presentan durante el desarrollo de estos animales.

ALTERACIONES METABOLICAS EN RATAS LACTANTES

Después del período embrionario en el que el feto se nutre totalmente a expensas de la madre y logra acumular depósitos energéticos en forma de glucógeno hepático y grasa marrón principalmente, el recién nacido se enfrenta con un rápido aumento de sus necesidades nutritivas, que satisface a expensas del uso de dichas reservas y de la leche materna, la cual se puede considerar como una dieta rica en grasas (ver Introducción). A pesar de este continuo aporte nutritivo aquí hemos visto que el crecimiento es lento durante los primeros días de la vida extrauterina, siendo el hígado uno de los órganos más afectados, de forma que aumenta de tamaño aún más lentamente que el peso corporal, sien-

do la relación hígado/peso corporal más baja en los animales de 5 y 10 días que en los adultos. Este retraso en el desarrollo hepático parece deberse a un período de latencia en los procesos de división celular, como lo indicarían los datos de DNA y núcleos aquí presentados. Este período parece durar hasta el día 10 del nacimiento, en el que se presenta un aumento en la concentración de DNA/núcleo, lo que se ha asociado en otras condiciones experimentales con una activación de la división celular (Vendrely, 1955). Esta interpretación está de acuerdo con el hecho de que el número de núcleos por hígado total no varía de los 5 a los 10 días del nacimiento, mientras que hay un gran aumento de los 10 a los 20 días. De hecho a partir de los 10 días, en que la relación hígado/peso corporal es mínima, comienza un aumento en el peso del hígado de forma que a los 20 días del nacimiento dicha relación es ya igual a la que se presenta en los animales adultos.

Es interesante destacar que parte de los cambios observados en el peso del hígado se deben no sólo al número de células, sino al tamaño de las mismas, que es menor en las ratas lactantes que en las adultas, ya que aquí hemos demostrado que por unidad de peso el número de núcleos y la concentración de DNA son máximos en los animales más jóvenes estudiados y disminuyen con la edad.

Lógicamente esta distinta celularidad hepática viene acompañada de cambios en la composición intrínseca del tejido, como lo demuestran los datos de fosfolípidos, proteí

nas y agua aquí presentados. La concentración de todos estos parámetros por célula está disminuida en las ratas jóvenes con relación a las adultas, lo que concuerda con el menor tamaño de sus hepatocitos. Hemos de indicar que a los 10 días hay un aumento apreciable de estos parámetros por núcleo con relación a los animales de 5 y 20 días lo que apoya la idea anteriormente apuntada de que ésta es una edad crítica en el desarrollo hepático. El ayuno hace que las células disminuyan de tamaño en todos los animales como lo demuestra el hecho del aumento del número de núcleos y cantidad de DNA (cuando se calcula por gramo de hígado), en estas condiciones. Esta disminución del tamaño celular podría ser en parte, consecuencia de la pérdida de agua. Sin embargo, el número total de células no varía como ocurre en los adultos y ha sido demostrado en otras ocasiones (Herrera y Freinkel, 1968; Herrera y Col., 1969). Existe una excepción que son los animales de 10 días en los que tras el ayuno el agua, proteínas y fosfolípidos/núcleo disminuyen mucho más que en los demás grupos y el DNA/hígado total baja significativamente, lo que no ocurría en el resto de los animales. Esto parece indicar que a esta edad se presenta una degeneración celular con el ayuno, posiblemente como consecuencia de la situación crítica en el desarrollo del hepatocito en que se encuentran estos animales.

Como índices groseros de los metabolismos de hidratos de carbono y lípidos, hemos determinado la concentración hepática de glucógeno y ácidos grasos.

Los niveles hepáticos de ac. grasos totales y libres son máximos en los animales de 5 días. A los 10 días hay una bajada en la concentración de ácidos grasos totales, de forma que ya no difieren estadísticamente de los adultos aunque todavía los niveles de ácidos grasos libres están elevados. Esta aumentada llegada de grasas al hígado a los 5 días debe provenir de la movilización de las acumuladas durante la vida fetal y de las procedentes de la leche materna, ya que se ha descrito que a esta edad la lipogénesis está inhibida (Ballard y Hanson, 1967). Una disminución o desaparición de la grasa marrón, junto con una inhibida lipogénesis podría explicar la bajada en la concentración de ácidos grasos totales que ocurre de los 5 a los 10 días aunque estos animales pueden mantener niveles elevados de ácidos grasos libres gracias a su dieta rica en grasas. La llegada de lípidos al hígado de los animales de 20 días debe estar aumentada ya que a esta edad las ratas todavía están tomando leche aparte de la dieta sólida de los adultos. A partir de esta edad, la lipogénesis empieza a aumentar y las grasas que llegan al hígado tras el destete deben ser formadas por el propio animal, ya que la dieta es muy pobre en grasas y rica en hidratos de carbono.

Nuestros datos sobre formación de lípidos "in vivo" durante la lactancia, corroboran lo expuesto anteriormente. La lipogénesis está inhibida hasta los 20 días de edad ya que, aunque la formación de lípidos totales- C^{14} es alta en los animales jóvenes, esto no representa verdadera

lipogénesis ya que prácticamente toda la radiactividad está en la fracción del glicerol de los glicéridos. A los 30 días la lipogénesis ya está funcionando como lo demuestra el hecho de que ya no toda la radiactividad está en dicha fracción, y por tanto los animales están formando sus propios ácidos grasos al igual que sucede en los adultos, en los que el glicerol de glicéridos representa un porcentaje aún más bajo que a los 30 días de los lípidos totales- C^{14} .

Cuando los animales se someten al ayuno, los ácidos grasos aumentan mucho en las ratas adultas y hay también una elevación aunque menor en los animales de 30 días, la cual está localizada solamente en los ácidos grasos totales y no en los libres. Este aumento tiene que ser consecuencia de una elevada movilización de sus depósitos periféricos de grasas, ya que la lipogénesis está inhibida en estas condiciones. En efecto, tras el ayuno sucede en estas edades lo que sucedía en las ratas más jóvenes cuando estaban alimentadas, es decir, casi toda la radiactividad de los lípidos está en forma de glicerol de los glicéridos.

La respuesta al ayuno es anómala en el resto de los grupos, ya que los niveles hepáticos de ácidos grasos libres y totales no cambian con respecto a cuando estaban alimentados en los animales de 5 y 10 días e incluso llega a haber una pequeña disminución en los ácidos grasos totales de las ratas de 20 días. Nuestros datos confirman que la lipogénesis continúa inhibida en estas condiciones y esta falta de respuesta al ayuno tiene que deberse a una amino-

rada movilización de las reservas periféricas de lípidos y y/o a una mayor utilización de éstos.

La concentración de glucógeno hepático es muy baja a los 5 días y va aumentando gradualmente a lo largo del período estudiado, de forma que ya a los 30 días este parámetro es totalmente normal. Estos cambios son paralelos a los descritos por Blázquez y Col., (1970) en los niveles de insulina plasmática. Probablemente como consecuencia de una relación insulina/glucagon disminuida, la glucogenolisis es muy alta durante los primeros días de vida, lo que podría explicar los bajos niveles hepáticos de glucógeno. A partir de los 20 días de edad hay un gran incremento en los niveles plasmáticos de insulina, lo que podría producir un aumento de la glucogénesis respecto a la glucogenolisis.

Las 24 horas de ayuno hacen que se produzca una bajada de glucógeno en todos los grupos, pero esta disminución es menor en los animales de 30 días y esto se acentúa aún más en los de 20 días. Este ahorro de glucógeno es posible que se deba a una aumentada utilización de lípidos, como veremos mas adelante.

Estos cambios en los niveles de ácidos grasos y glucógeno demuestran que, durante la lactancia, se presentan grandes alteraciones en las interrelaciones de hidratos de carbono y grasas, posiblemente como consecuencia de las adaptaciones enzimáticas que van ocurriendo durante este período.

En el presente estudio hemos determinado parámetros que nos pueden dar un índice más fino de la regulación

de estas interacciones. Nos han interesado en particular el Ac-CoA, ac.cítrico, ac.pirúvico y ac.láctico. Como ya se indicó en la Introducción, el Ac-CoA tiene una posición privilegiada en el cruce de las vías metabólicas de hidratos de carbono y grasas, al mismo tiempo de ejercer un directo papel regulador de tipo alostérico sobre determinados enzimas participantes en estas vías (fig.1).

La concentración hepática de Ac-CoA es igual en las ratas de 5, 10 y 30 días que en las adultas, mientras que este parámetro está disminuido en las de 20 días, cuando están alimentadas. Esta bajada de Ac-CoA hepático podría ser una consecuencia de un aumento en el uso de este metabolito para la lipogénesis que según Ballard y Hanson, (1967) comienza a aumentar a partir de esta edad, en condiciones en que la cetogénesis parece todavía estar elevada.

Hay que hacer notar, que el hecho de que en todas las ratas jóvenes no aparezcan niveles hepáticos de Ac-CoA superiores a los de los adultos, a pesar de la aumentada llegada de grasas al hígado, no tiene porqué significar que su producción no sea mayor, sino que podría ser consecuencia de una mayor utilización de este metabolito durante la lactancia.

Tras el ayuno el Ac-CoA aumenta en todos los grupos, pero este aumento es mayor en las adultas lo cual podría deberse, como en el caso anterior, a una disminuida síntesis o a una elevada utilización.

Con la finalidad de decidir si hay o no alguna va

riación en la utilización de Ac-CoA para la formación de ácido cítrico y para la síntesis de cuerpos cetónicos, hemos de terminado estos parámetros.

Los niveles hepáticos de ac.cítrico son similares en todos los grupos estudiados cuando los animales están alimentados. Sin embargo, la respuesta al ayuno difiere en las distintas edades. Mientras que en los animales de treinta días y adultos el cítrico disminuye con el ayuno como sucede en otras ocasiones (Herrera y Freinkel, 1968; Herrera y Col., 1969), en las de 20 no cambia y en las de 5 y 10 días aumenta.

Aunque no hay datos en la literatura relacionados con el metabolismo del ácido cítrico en el ayuno durante la lactancia, es posible que exista una disminuida utilización de este metabolito en los animales de 5 y 10 días, lo cual concuerda con el hecho de que la actividad citrato liasa está disminuida en estos animales, al menos cuando están alimentados (Ballard y Hanson, 1967). El aumento de ácido cítrico que aparece en estos animales tras el ayuno, podría deberse también a una elevada síntesis de este metabolito como consecuencia de una gran disponibilidad de Ac-CoA y oxalacetato para que se efectúe la reacción catalizada por la citrato sintetasa. De acuerdo con esta explicación y de forma contraria a como ocurre en los adultos, el oxalacetato no habría disminuido con el ayuno en estos animales. Esta asequibilidad de OAA podría explicarse por la elevada actividad de la aspartato transaminasa que existe en el hí-

gado de estos animales (Yeung y Oliver, 1967) y/o por una falta de activación de su utilización para gluconeogénesis, ya que es la única vía conocida por la que han de pasar la mayor parte de los sustratos gluconeogénéticos (aminoácidos, pirúvico, láctico, etc.), para llegar a formar glucosa.

Habíamos dicho que el Ac-CoA podría escapar del ciclo de Krebs para formar cuerpos cetónicos. La concentración de éstos está aumentada durante la lactancia, lo que debe ser consecuencia de la abundancia de lípidos procedentes de la leche materna junto con una gran actividad de la maquinaria enzimática encargada de la cetogénesis (Lockwood y Bailey, 1971; Lee y Fritz, 1971). Nuestros resultados demuestran que la concentración plasmática de cuerpos cetónicos a lo largo de la lactancia, es paralela a la concentración hepática de su sustrato, es decir, los ácidos grasos. Estos elevados niveles de cuerpos cetónicos circulantes deben tener gran importancia fisiológica en estos animales, ya que se ha demostrado que son utilizados en gran cantidad durante la lactancia, especialmente por el cerebro, lo que les permite ahorrar glucosa.

El ayuno hace que aumente la cetosis en todos los grupos, aunque este aumento es mayor en los animales jóvenes que en los adultos.

Relacionando estos datos con los anteriormente discutidos de Ac-CoA y cítrico, podemos concluir que los animales jóvenes disponen de tal cantidad de grasas, que pueden disfrutar de niveles hepáticos normales de Ac-CoA y ac.cítri

co junto con un gran aumento de cuerpos cetónicos circulantes, cuando están alimentados.

Tras el ayuno esta situación es aún más drástica, pudiendo mantener la elevada cetogénesis sin disminuir, sino, por el contrario, aumentando la formación de ácido cítrico a costa de un menor aumento de Ac-CoA hepático. Toda esta situación, que es completamente distinta a la que ocurre en los adultos, se va normalizando a medida que los animales se van haciendo mayores y la leche materna (rica en grasas), va siendo sustituida por la comida sólida de los adultos (rica en hidratos de carbono). Es muy interesante observar que cuando todavía el animal utiliza leche y ha comenzado a comer dieta sólida, el panorama metabólico es intermedio, como lo indica la ausencia de cambio en la concentración de ácido cítrico, con el ayuno, en los animales de 20 días. En las ratas de 30 días, aunque todavía se mantiene la cetosis en el ayuno, la respuesta del ac. cítrico y Ac-CoA se acerca más a la de los adultos.

Esta gran asequibilidad de lípidos en la lactancia podría repercutir en el potencial redox citoplásmico de estos animales, ya que por lo general un aumento de la β -oxidación viene asociado con una elevación de la relación NADH/NAD. Dado que este parámetro puede ser determinado de forma indirecta por la valoración de la relación láctico/pirúvico (Williamson y Col., 1967), en la presente tesis hemos llevado a cabo dicha determinación. Como era de esperar, esta relación está aumentada en los animales jóvenes con respecto a los adultos, lo que concuerda con una

mayor β -oxidación en la lactancia, como sugerimos anteriormente.

Lógicamente, todos estos cambios en el estado estacionario de metabolitos reguladores deben venir acompañados de alteraciones en la actividad gluconeogénica de estos animales.

Cuando los animales están alimentados, la síntesis de glucosa "in vivo" a partir de ácido pirúvico está aumentada en todos los animales jóvenes con relación a los adultos. El hecho de que esta diferencia se aprecia tanto a partir de concentraciones traza del precursor, como utilizando cantidades más altas (es decir, concentraciones sustrato), demuestra que hay un verdadero aumento de la gluconeogénesis de los animales lactantes frente a los adultos y que no se trata de un artefacto como consecuencia de diferencias en la concentración endógena de metabolitos entre los grupos. No es sorprendente esta mayor actividad gluconeogénica de las ratas jóvenes, ya que es bien conocido el hecho de que cuando hay un aumento de la llegada de lípidos al hígado se presenta una activación de la gluconeogénesis hepática, como suceden en el caso de animales adultos sometidos a una dieta rica en grasa (Blázquez y Col., 1971) y de animales en ayunas (Herrera y Col., 1969). Posiblemente, este fenómeno es consecuencia del efecto inhibidor que ejercen los ácidos grasos sobre ciertos enzimas glicolíticos (Weber y Col., 1966) y en consecuencia, activador de la vía opuesta: la gluconeogénesis.

Aunque nosotros no lo hemos estudiado, también la gluconeogénesis renal podría estar aumentada en estos animales, ya que se ha demostrado una correlación directa entre ésta y una bajada del pH sanguíneo (Owen y Col., 1969). Un aumento en la concentración de cuerpos cetónicos plasmáticos, que produce una bajada de pH en la sangre, viene acompañada de una activación de la gluconeogénesis renal (Herrera y Col., 1969). Así pues, como en las ratas jóvenes los niveles circulantes de cuerpos cetónicos están elevados, parte de la aumentada actividad gluconeogénica podría estar representada por la glucosa sintetizada en el riñón.

El ayuno origina un aumento en la formación de glucosa- C^{14} , a partir de concentraciones traza de pirúvico- C^{14} , en las ratas de 5 y 10 días de edad, que es solamente aparente, ya que cuando el pirúvico se administra en concentraciones sustrato desaparecen las diferencias entre los animales alimentados y ayunados y aún llega a haber una disminución en la formación de glucosa a los 5 días, con el ayuno.

Se puede pues, concluir que no hay verdadera activación de la gluconeogénesis con el ayuno en los animales de 5 y 10 días, lo que concuerda con los datos de ácido cítrico que recordaremos que aumenta con el ayuno al no haber aumento de la utilización del oxalacético para la gluconeogénesis, como es el caso de los animales adultos.

En los animales de 20 días se presenta una situación intermedia ya que, aunque la formación de glucosa- C^{14} plasmática no aumenta con el ayuno, sí lo hace y de una ma-

nera muy significativa el glucógeno- C^{14} hepático, lo que se puede relacionar, al menos en parte, con la menor pérdida de glucógeno que ocurre en dichos animales en esta condición alimenticia.

Las ratas de 30 días se comportan de una forma más similar a las adultas: en ambos grupos es muy significativa la activación de gluconeogénesis con el ayuno, tanto para la formación de glucosa plasmática como de glucógeno hepático. Recordaremos que en estos animales el cítrico disminuye tras el ayuno, posiblemente como consecuencia de una falta de oxalacetato para acoplarse con el Ac-CoA por estarse utilizando para la síntesis de glucosa, como indicamos anteriormente.

Los datos que aquí hemos obtenido referentes a la actividad específica de la glucosa- C^{14} y glucógeno- C^{14} formados a partir del ácido pirúvico C^{14} , confirman las anteriores conclusiones.

Todas estas interacciones han afectado los niveles de glucosa en los diferentes grupos. La glucosa en sangre es algo más baja en los animales alimentados de 5 días de edad que en los adultos y el nivel aumenta en los de 10 días, desapareciendo las diferencias con aquellos. A pesar de la ingesta tan pobre en carbohidratos que tienen estos animales, consiguen mantener unos niveles bastante aceptables de glucosa. Esto ha de deberse a la aumentada gluconeogénesis que se presenta a estas edades y a la mayor glucogenolisis (como lo demuestran los bajos niveles de glucógeno hepático), así como a la aumentada asequibilidad de lípidos. La abundancia de lípidos permite unos altos niveles de cuerpos ce-

tónicos y como hemos dicho anteriormente, esta elevación de la cetosis debe tener gran importancia energética ya que los animales pueden utilizarlos en gran cantidad, especialmente en el cerebro (Page y Col., 1971), lo que les permitirá economizar glucosa.

Este cuadro metabólico (elevada gluconeogénesis, bajos niveles de glucógeno y gran utilización de lípidos), se asemeja al que aparece en los adultos tras el ayuno o cuando están alimentados con una dieta rica en grasa (Blázquez y Col., 1971) y como en éstos, podría haber sido inducido por una disminución de la relación insulina/glucagón.

La glucosa sanguínea aumenta de los 10 a los 20 días, apareciendo a esta edad niveles significativamente más altos que los de los adultos; esta diferencia desaparece a los 30 días.

La elevación de la glucosa en los animales de 20 días, junto con un aumento de la concentración de glucógeno en hígado, podría deberse al efecto yuxtapuesto de la alta asequibilidad de lípidos (los cuerpos cetónicos continúan siendo muy altos a esta edad), la elevada gluconeogénesis y el aumento de hidratos de carbono en la dieta, ya que los animales ya han comenzado a tomar comida de adultos además de la leche.

A diferencia con los demás grupos, la glucosa en sangre no cambia con el ayuno en las ratas de 20 días, lo cual podría deberse a la situación privilegiada de estos animales, que disponen de suficientes reservas hidrocarbonadas junto con el mantenimiento de un manejo de lípidos aumenta-

do, que les permite un máximo ahorro de glucosa, como lo demuestra también la menor disminución del glucógeno hepático.

Las ratas de 30 días de edad muestran un panorama bastante cercano al de los adultos, aunque todavía disfrutan de una alta asequibilidad de lípidos, como lo demuestra el hecho de que su cetosis, cuando están ayunadas, es mayor que la de los animales adultos, lo que les permite una mejor preservación del glucógeno hepático en dicha situación alimenticia.

En resumen:

Los cambios metabólicos que ocurren en la rata después del nacimiento, pueden ser divididos en tres fases:

La primera comienza inmediatamente después del nacimiento y dura todo el tiempo en que el animal se alimenta exclusivamente de la leche materna. Durante esta fase una aumentada relación glucagón/insulina, ayuda a moderar la hipoglucemia del recién nacido, aumentando la glucogenolisis y gluconeogénesis hepáticas de los animales que están consumiendo una dieta rica en grasas y pobre en hidratos de carbono: la leche materna. En el ayuno no se produce una hipoglucemia exagerada en estos animales, a pesar de que no aumenta su gluconeogénesis, gracias a la elevada oxidación de lípidos.

La segunda fase viene representada por el período que transcurre desde que el animal empieza a mezclar la leche materna con comida de adultos, hasta el final de la lactancia. Es una fase de gran anabolismo, con un gran crecimiento

to corporal, donde el animal se aprovecha del aumento de hidratos de carbono en la dieta, junto con su gran asequibilidad de lípidos, para preservar al máximo su glucosa sanguínea incluso en ayunas.

La tercera fase comienza al final de la lactancia, cuando el animal se ha adaptado totalmente a una dieta rica en hidratos de carbono, típica de la rata adulta de laboratorio.

ALTERACIONES METABOLICAS EN EL HIPO E HIPERTIROIDISMO

El segundo modelo experimental que hemos estudiado en la presente tesis para determinar los mecanismos de regulación de las interrelaciones de hidratos de carbono y grasas ha sido el hipo e hipertiroidismo producidos por la tiroidectomía y la administración de distintas dosis de tiroxina exógena. Los datos aquí presentados demuestran que diferencias en la función tiroidea alteran el metabolismo de hidratos de carbono y grasas y que estas alteraciones son más aparentes cuando los animales se someten al ayuno y han de recurrir a sus propias reservas.

Animales intensamente hipotiroideos

Hemos visto que las ratas tiroidectomizadas y mantenidas con una dieta pobre en iodo muestran un intenso hipotiroidismo, como lo demuestra la enorme bajada del iodo ligado a proteínas plasmático (índice de la concentración de hormonas tiroideas circulantes) y del aumento de la hor-

mona tirotrópica (TSH) en plasma. Esta elevación del TSH es consecuencia de un esfuerzo de la hipófisis para compensar el descenso de la llegada de dichas hormonas a los tejidos extratiroideos y esta mediado por el TRH hipotalámico. Esta compensación no se logra ya que, al carecer de tiroides, estos animales no tienen capacidad para fabricar hormonas tiroideas como respuesta a dicha activación hipofisaria.

Cuando estos animales intensamente hipotiroideos están alimentados, la mayor parte de los metabolitos hepáticos son normales, excluido el ácido pirúvico, que es más bajo. Esto hace que la relación láctico/pirúvico esté aumentada en estas ratas, lo cual podría ser explicado por una utilización disminuida de equivalentes reducidos, para procesos biosintéticos, en ausencia de hormonas tiroideas (Mehnan y Wieland, 1969). El desplazamiento del equilibrio redox citoplásmico hacia un estado reducido, puede estar facilitando una preponderancia de la gluconeogénesis sobre la utilización de glucosa en esos animales (Williamson y Col., 1967). Aunque la actividad de los enzimas gluconeogénicos puede estar disminuida con la tiroidectomía, hemos visto que el estado estacionario de metabolitos reguladores como el Ac-CoA y ácido cítrico es normal en estos animales, lo cual concuerda con la normal actividad gluconeogénica de animales sometidos a condiciones similares a los nuestros, descrita recientemente en nuestro laboratorio (Castro, 1972). Los bajos niveles de insulina circulante que encontramos en este grupo, producidos por una disminuida secreción pancreática (Malaisse y Col., 1967), pueden estar contribuyendo al

mantenimiento de una gluconeogénesis normal en estos animales.

Este conjunto de factores hace que los animales tiroidectomizados puedan mantener una glucemia normal y unos niveles hepáticos de glucógeno también normales.

Este equilibrio se rompe cuando los animales son sometidos al ayuno; en estas condiciones se presenta una franca hipoglucemia, mucho más acentuada que en los animales normales y una enorme disminución de glucógeno hepático, que alcanza niveles casi indetectables.

Ya que una exagerada hipoglucemia en el ayuno no es normal en el hipotiroidismo (Metzger y Freinkel, 1971), es probable que sea consecuencia de un fallo hipofisario más que tiroideo. Nosotros hemos visto que la hipófisis está muy alterada ya que nuestras ratas tiroidectomizadas sufren una detención del crecimiento debida a la gran disminución de GH hipofisaria que aparece en estos animales.

Menahan y Wieland (1969) han sugerido que la gluconeogénesis hepática está inhibida en los animales hipotiroideos en ayunas, pero el estado estacionario de metabolitos reguladores no parece apoyar esta idea. Por una parte la relación láctico/pirúvico es alta, lo que ayudaría a mantener la gluconeogénesis. Hemos visto también que el Ac-CoA (activador alostérico de la piruvato carboxilasa), aumenta con el ayuno en los animales tiroidectomizados, lo mismo que sucede en los controles. Por otra parte, los ácidos grasos son gluconeogénicos y como veremos más adelan-

te, la llegada de ácidos grasos al hígado es alta en estos animales en ayunas. Recientemente se ha demostrado en nuestro laboratorio (Castro, 1972) que los animales tiroidectomizados presentan una gluconeogénesis en el ayuno que no difiere de la de animales normales. Creemos que la contradicción entre nuestros resultados y los descritos por Menahan y Wieland (1969) es solamente aparente, ya que la formación de glucosa y la utilización de lactato por el hígado perfundido encontradas por dichos autores no era diferente en los animales hipotiroideos de los controles de la misma edad. Por otra parte, cuando la actividad gluconeogénica se expresa por hígado total en ambos casos se presenta una reducción, pero sin embargo, esta reducción de gluconeogénesis se compensa cuando se corrigen los datos por el peso corporal, que está muy disminuido en las ratas tiroidectomizadas con relación a las normales. Consideramos que estos parámetros tienen verdadera significatividad fisiológica cuando son corregidos de esta forma (por masa total), ya que nos dan un índice de la economía metabólica del animal completo.

Como ya hemos apuntado antes, nuestros resultados parecen indicar que en las ratas tiroidectomizadas hay una elevada lipolisis en el ayuno y una aumentada llegada de ácidos grasos al hígado, ya que la concentración hepática de fosfolípidos es más baja que en los controles, mientras que es igual la de ácidos grasos totales, lo que significa una mayor concentración de ácidos grasos libres y esterificados de neutralípidos en estos animales que en los contro-

les. Esta abundancia de ácidos grasos en el hígado de los animales hipotiroideos tras el ayuno no es sorprendente, ya que se sabe que la retención de grasas está favorecida en esos animales (Scow, 1951) y aunque se ha descrito una disminución basal de lipólisis en tejido adiposo (Debons y Schwartz, 1961), cuando la verdadera actividad lipolítica se determina corrigiendo por la reutilización del glicerol en el tejido adiposo (Herrera y Lamas, 1970), dicha vía metabólica está altamente aumentada en las ratas tiroidectomizadas en ayunas (Montoya, 1972).

Cuando los animales están ayunados, la gran disponibilidad de lípidos les permite mantener un estado estacionario de Ac-CoA igual al de los controles, a pesar de estar manteniendo una concentración hepática de ácido cítrico tan alta como cuando estaban alimentados y unos niveles de cuerpos cetónicos aun más altos que los de los controles, probablemente como consecuencia de una elevada cetogénesis (Menahan y Wieland, 1969).

Los resultados de ácido cítrico hepático merecen especial atención. En los animales normales hay una pérdida de oxalacetato en el ayuno, lo que hace que el Ac-CoA se escape del ciclo de Krebs para ir a formar cuerpos cetónicos. En el caso de las ratas hipotiroideas el ácido cítrico no cambia con el ayuno, lo que hace pensar que el oxalacetato no ha debido disminuir en el hígado de estos animales. Este fenómeno podría explicarse por un acelerado catabolismo proteico que permita una continua formación de OAA a partir de aminoácidos, en cuyo caso esta situación sería

comparable a la que presentan animales normales tras un ayuno prolongado, en los cuales el ácido cítrico hepático es igual al de animales alimentados (Herrera y Freinkel, 1968) y podría indicar un ayuno acelerado en las ratas hipotiroides. Esta posibilidad viene apoyada por la mayor disminución con el ayuno del tamaño del hígado en los animales tiroidectomizados, lo cual se presenta junto con una mayor pérdida de la masa de los hepatocitos, como lo indican nuestros datos de DNA.

Hemos de indicar que no todas las alteraciones metabólicas que aparecen en las ratas intensamente hipotiroides, tienen que ser directamente una consecuencia de la falta de hormonas tiroideas, ya que, como hemos visto aquí, los niveles de otras hormonas, (TSH, GH e insulina), de las que se conoce que tienen efecto sobre estas vías metabólicas, están afectados en estos animales.

Compensación del intenso hipotiroidismo mediante la administración de pequeñas dosis de tiroxina exógena a animales tiroidectomizados

La administración de 0.1 μ g de T_4 a las ratas tiroidectomizadas es suficiente para normalizar o al menos disminuir las diferencias con los controles, en gran parte de los parámetros estudiados. Aunque la insulina es algo más baja que en los controles cuando estaban alimentados, estos animales responden normalmente al ayuno disminuyendo sus niveles, lo que no sucedía con los animales tiroidectomizados. La bajada de glucosa y glucógeno con el ayuno ya

no es tan exagerada como en dichos animales, aunque todavía es mayor que en los controles. La relación láctico/pirúvico es ya normal y lo mismo la respuesta al ayuno del ácido cítrico.

Todo esto sucede a pesar de que el PBI plasmático es todavía mucho menor que el de los animales controles y de que esa dosis de tiroxina es unas veinte veces menor que la necesaria para disminuir la alta liberación de TSH por la hipófisis a valores normales (Purves, 1964). De hecho, nosotros hemos comprobado aquí que los niveles plasmáticos de TSH continúan muy elevados en este grupo experimental.

Existe la posibilidad de que la tendencia a la normalización del metabolismo intermediario en animales tiroidectomizados requiere dosis extremadamente pequeñas de hormonas tiroideas, insuficientes para disminuir los elevados niveles de TSH plasmáticos, pero suficientes para restaurar, al menos parcialmente, las otras alteraciones endocrinas que acompañan al hipotiroidismo intenso. Así, hemos visto aquí que las ratas tiroidectomizadas tratadas con 0.1 μ g de T_4 crecen más que las no tratadas con esta hormona, aunque sin lograr el tamaño corporal de sus respectivos controles y al mismo tiempo, los niveles de insulina son totalmente normales en el ayuno.

Otra posibilidad es que las alteraciones que aparecen en el metabolismo intermediario de ratas hipotiroideas sean secundarias al funcionamiento inadecuado de la

hipófisis y las glándulas dependientes de ésta. Esto viene apoyado por el hecho de que ratas sometidas crónicamente a una dieta pobre en iodo (Castro y Col., 1971) con bajo PBI y alto TSH, pero que tienen un contenido hipofisario normal de hormona de crecimiento y unos niveles de insulina también normales, mantienen un metabolismo intermediario igual que el de ratas controles, tanto cuando están alimentadas como cuando están ayunadas.

Por otra parte, el hecho de que no todos los metabolitos estudiados se hayan normalizado en las ratas tiroidectomizadas inyectadas con 0.1 μ g de tiroxina, podría sugerir una sensibilidad diferente de las distintas vías metabólicas en que intervienen dichos metabolitos a las hormonas tiroideas.

La anterior conclusión viene también apoyada por los datos de los animales tiroidectomizados tratados con 2 μ g de tiroxina en los que todos los parámetros estudiados son normales, tanto en las ratas alimentadas como en las ayunadas, con excepción de la glucosa e insulina circulantes cuando están alimentados: la glucosa es algo más baja y la insulina más alta. Estos resultados sugieren un pequeño incremento, con respecto a los animales normales, en la disponibilidad de hormonas tiroideas y una alta sensibilidad del páncreas.

El incremento en la cantidad de hormonas tiroideas que llegan a los tejidos extratiroideos se debe a que, a pesar de que el PBI es muy parecido al de los controles,

los animales fueron sacrificados después de 16 horas de la última inyección de tiroxina y como la vida media de la tiroxina es muy corta (Sterling, 1964), los animales tratados con 2 μ g de T_4 han tenido que disfrutar antes de niveles de hormonas tiroideas más altos que los animales controles.

Las diferencias con los controles desaparecen con el ayuno, posiblemente debido a una sensibilidad menor al estímulo de la secreción de insulina en ese estado.

Animales hipertiroideos

La inyección diaria de 25 μ g de T_4 ha sido suficiente para que los animales se hayan hecho hipertiroideos, como lo demuestran los altos niveles de FBI (más del doble de lo normal) y los bajos niveles de TSH circulante.

Lo más aparente en estos animales es su peso corporal disminuido, lo que ha de deberse al estado de intenso catabolismo que aparece en el hipertiroidismo (Freinkel y Metzger, 1971) y no a alteraciones en la hipófisis, ya que aquí hemos visto que el contenido hipofisario de hormona de crecimiento es normal.

Cuando los animales están alimentados los parámetros alterados son el glucógeno hepático y la glucosa e insulina circulantes. El glucógeno hepático está disminuido en los animales hipertiroideos, como ya había sido observado anteriormente (Coggeshall y Greene, 1933; Kuriyama, 1918). Este reducido acúmulo de glucógeno puede reflejar una aumentada actividad de la adenil-ciclasa en el hígado (Freinkel y Metzger, 1971), lo que produciría un aumento de glucoge-

olisis junto con una inhibición de la glucogénesis. La activación de la glucogenolisis debe estar también facilitada en estos animales por la elevación de los niveles de la fosforilasa (Hornbrook y Col., 1965).

Posiblemente la gluconeogénesis está aumentada en estos animales, ya que los enzimas gluconeogénéticos aumentan tras la administración de tiroxina (Menahan y Wieland, 1969, Szepesi y Freedland, 1969) y además disponen de suficientes sustratos para su mantenimiento. Entre estos sustratos gluconeogénéticos se encuentran los aminoácidos que proceden del catabolismo proteico y el glicerol procedente de la lipolisis, la cual es muy activa en estos animales (Montoya, 1972), posiblemente como consecuencia de la elevada actividad de la adenil-ciclasa en el tejido adiposo (Brodie y Col., 1966) y de la gran sensibilidad de dicho tejido a diferentes hormonas lipolíticas.

De hecho Freedland y Krebs (1967) han demostrado que los hígados perfundidos de ratas hipertiroideas, fabrican más cantidad de glucosa que los de animales normales y aunque también la utilización de glucosa está aumentada en el hipertiroidismo, nuestras ratas tiroidectomizadas tratadas con 25 μ g de tiroxina son hiperglucémicas. Esto parece indicar que, en nuestros animales hipertiroideos, las vías encargadas de la síntesis de glucosa son más activas que las de su utilización.

La hiperglucemia aparece junto con altos niveles de insulina circulante, lo que está en contradicción con los

resultados de Malaisse y Col., (1967) que han demostrado que el tratamiento de ratas normales con altas dosis de T_4 causa una gran reducción en el contenido y secreción pancreática de insulina. Sin embargo, dichos autores utilizan distintas dosis y condiciones experimentales a las nuestras, ya que administran durante cuatro días, a animales normales, una dosis diez veces mayor que la que reciben nuestros animales tiroidectomizados durante dos meses y esto podría explicar los diferentes resultados.

Nosotros pensamos que la tiroxina debe tener un efecto bifásico en el metabolismo de la insulina, como ocurre con otros efectos de la hormona. Esto viene apoyado por el hecho de que la secreción de insulina disminuye tras la tiroidectomía y aumenta cuando se administran dosis pequeñas de tiroxina ($1.5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ de peso corporal) (Malaisse y Col., 1967). Por tanto, esta hormona tiene un efecto estimulante sobre la secreción de insulina, aunque la administración de dosis farmacológicas produzca el efecto contrario. De acuerdo con esta interpretación, la dosis utilizada por nosotros ha producido una estimulación de la secreción de insulina más alta de lo normal, lo que se traduce en unos altos niveles circulantes de esta hormona. Estos altos niveles de insulina han de deberse a una secreción aumentada y no a una degradación disminuida de dicha hormona, ya que se ha demostrado que la degradación de insulina está acelerada en la tirotoxicosis (Cohen, 1957; Elgee y Williams, 1955).

La situación de nuestros animales hipertiroideos

es diabetogénica, como lo demuestra la hiperglucemia que presentan, lo cual junto con los altos niveles de insulina circulante sugiere que estos animales tienen una aumentada resistencia a la insulina.

Cuando las ratas hipertiroideas se someten al ayuno, la glucosa e insulina circulantes continúan siendo más elevadas que en los controles, pero el cuadro metabólico cambia completamente. Se ha descrito que en ratas ayunadas tratadas con dosis farmacológicas de T_4 la gluconeogénesis es muy elevada (Freedland y Krebs, 1967; Menahan y Wieland, 1969), sin embargo, aquí hemos observado que el estado estacionario de metabolitos reguladores en el hígado de nuestros animales hipertiroideos no es el apropiado para inducir gluconeogénesis "in vivo", ya que:

1^o- Ninguno de los parámetros relacionados con el metabolismo de los lípidos estudiados en el hígado (fosfolípidos, ácidos grasos totales y Ac-CoA), cambian con el ayuno en los animales tratados con 25 μ g de tiroxina, lo que indica que, calculados por hígado total, la concentración de estos metabolitos disminuye con el ayuno. Esto sugiere una llegada disminuida de lípidos al hígado desde los depósitos periféricos, a pesar de que se ha descrito que la lipólisis "in vivo" del tejido adiposo está aumentada en la tirotoxicosis (Fisher y Ball, 1967). Sin embargo, este incremento "in vitro" de la lipólisis no significa necesariamente que la liberación neta "in vivo" de ácidos grasos esté aumentada en esos animales cuando están ayunados, ya que

esto depende de la cantidad total de glicéridos almacenados. Puesto que la utilización de lípidos está enormemente acelerada en la tirotoxicosis cuando el animal está alimentado (Montoya, 1972), las reservas de lípidos deben estar casi completamente agotadas tras las 48 hr. de ayuno en nuestros animales experimentales, lo que puede explicar que no aumente la llegada de lípidos al hígado con el ayuno. Esta falta de reservas lipídicas parece estar compensada, al menos parcialmente, por un catabolismo proteico incrementado, lo que viene sugerido por el hecho de que las proteínas hepáticas disminuyen con el ayuno cuando se calculan por hígado total, lo cual no sucede en los otros grupos estudiados.

2º- En nuestros animales hipertiroideos la relación láctico/pirúvico no cambia con el ayuno, conservando la misma relación NADH/NAD que cuando estaban alimentados. Por tanto, no se está favoreciendo la formación de 3-fosfogliceraldehído para la gluconeogénesis, al contrario de lo que sucede en animales normales.

3º- Los niveles hepáticos de ácido cítrico tampoco cambian con el ayuno en los animales hipertiroideos, siendo más altos que los que presentan los animales controles. Esto sugiere que el oxalacetato se está utilizando para reaccionar con el Ac-CoA de la misma forma que cuando estaban alimentados, en lugar de ser preferencialmente carboxilado por la fosfo-enol-piruvato carboxilasa para la gluconeogénesis. Esta explicación viene apoyada por la ausencia de aumento en los niveles de Ac-CoA, junto con la menor elevación de cuerpos cetónicos circulantes con el ayuno que apa

rece en estos animales.

A pesar de que todo lo dicho anteriormente sugiere que la gluconeogénesis no cambia con el ayuno en las ratas tiroidectomizadas inyectadas con 25 μ g de T_4 , hemos visto que continúan teniendo unos niveles de glucosa en ayunas más altos que los animales normales, lo que podría apuntar hacia una menor utilización de este metabolito, a pesar de los altos niveles circulantes de insulina. Todo este cuadro metabólico es comparable al que aparece en otras situaciones diabetogénicas, como es el caso de los ratones obesos hiperglucémicos en los que ni los metabolitos reguladores hepáticos ni la gluconeogénesis cambian con el ayuno, pero presentan hiperglucemia y altos niveles de insulina (Sandler y Col., 1968; Stauffacher y Col., 1967).

REGULACION DEL METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO Y GRASAS EN LAS DISTINTAS CONDICIONES EXPERIMENTALES AQUI ESTUDIADAS

El centro principal donde confluyen las interrelaciones de hidratos de carbono y grasas en el organismo es el hígado, cuyo ritmo metabólico juega un papel trascendental en la regulación de la homeostasis energética del animal completo. En primer lugar, la actividad metabólica de un tejido depende de la concentración (o actividad) de los enzimas que en él se encuentran. Sin embargo, la mayor parte de los enzimas de un tejido funcionan por debajo de

su velocidad máxima, debido a una falta de suficiente sustrato y por consiguiente, cambios en la concentración de éste afectarán la actividad del enzima correspondiente. Sin variar la concentración absoluta del enzima ni del sustrato, la actividad de aquel puede ser afectada por los llamados factores alostéricos, que son metabolitos que originan un cambio configuracional en la estructura terciaria de la proteína, de forma que facilitan o disminuyen la afinidad del lado isostérico del enzima por su sustrato (Harper, 1969). Finalmente, el conocimiento de la actividad de un enzima, de las concentraciones de su sustrato y de los factores reguladores de la misma en un tejido, no es suficiente para conocer como dicho enzima está funcionando dentro de la célula, dentro de un tejido, dentro de un órgano o en el animal completo. La compartimentación celular hace por ejemplo que muchas veces el enzima no sea asequible al sustrato, o que aunque exista una elevada concentración de un factor activador o inhibidor del enzima no afecte a la actividad de éste por no encontrarse en el mismo compartimento.

Estos y otros muchos factores (acción de las hormonas sobre los enzimas, cambios fisiológicos del pH intracelular, etc.) hacen en muchos casos extraordinariamente difícil extrapolar resultados obtenidos en condiciones "in vitro" con enzimas purificadas, al animal "in vivo".

Estas consideraciones nos llevaron a estudiar los mecanismos reguladores de las interrelaciones hidratos de carbono y grasas en el hígado "in vivo" en distintas condiciones experimentales en las que conocíamos que se encontraban alteradas, relacionándolos con los cambios metabólicos en el animal completo.

Del presente estudio en animales alimentados o en ayunas, lactantes o adultos, hipo o hipertiroideos, podemos destacar algunos puntos trascendentales que son comunes a todas estas situaciones.

Aquí hemos visto que el ayuno en animales normales, el período de lactancia y el hipertiroidismo en animales alimentados o el hipotiroidismo en animales en ayunas, son condiciones en las que se presenta un aumento en la llegada de lípidos al hígado, aunque inducido por diferentes motivos (en unos casos desencadenados por alteraciones hormonales, como en el ayuno o el hipo e hipertiroidismo, y en otros, por cambios en la ingesta, como es el caso de los animales lactantes). Este efecto común, una inundación de lípidos en el hígado, hemos visto que afecta de distinta manera el estado estacionario de metabolitos hepáticos. Así, mientras que la concentración de Ac-CoA no difiere de las de sus correspondientes controles en las ratas lactantes e hipertiroideas alimentadas y en las hipotiroideas ayunadas, en las adultas hay un aumento con el ayuno en dicho parámetro. Al mismo tiempo el ac. cítrico es igual al de sus respecti-

vos controles en los animales lactantes y en los hipertiroideos, mientras que en los hipotiroideos sometidos al ayuno dicho parámetro es mayor que en sus controles respectivos y en los animales normales. adultos disminuye significativamente con el ayuno.

De alguna forma, estos resultados indican que aunque en las citadas condiciones experimentales la llegada de lípidos al hígado está aumentada, su utilización difiere de unos grupos a otros. La forma en que estos lípidos se utilizan, puede deducirse en función de dichos parámetros (acetil-CoA y ácido cítrico) y de los niveles plasmáticos de cuerpos cetónicos, los cuales están elevados en las ratas lactantes alimentadas, en las adultas en ayunas, y en las hipotiroideas en esta misma condición alimenticia, mientras que en las hipertiroideas no difieren de sus respectivos controles. Así pues, en las ratas lactantes los productos de la β -oxidación de los ácidos grasos son suficientes para mantener niveles normales de ácido cítrico y Ac-CoA hepáticos y una activa cetogénesis. En los animales en ayunas también hay activación de la β -oxidación, pero el Ac-CoA se escapa del ciclo de Krebs (posiblemente por falta de OAA, que se está utilizando para la gluconeogénesis) para lograr mantener elevados los cuerpos cetónicos, que pueden ser utilizados como fuente de energía y de esta forma ahorrar glucosa. En los animales hipertiroideos alimentados, sin embargo, estos parámetros se mantienen en niveles normales, sugi-

riendo que, en caso de que haya una elevada cetogénesis, es compensada por una activa utilización de cuerpos cetónicos. Finalmente, nos encontramos con una situación muy particular, como es la de las ratas hipotiroideas en ayunas, las cuales mantienen niveles de Ac-CoA normales junto con niveles elevados de ácido cítrico y cuerpos cetónicos. Lógicamente, esta elevación de los cuerpos cetónicos puede ser consecuencia de una menor utilización de los mismos, pero el hecho es que al hígado de estos animales han llegado suficientes ácidos grasos para mantener aumentado el ácido cítrico sin variar la concentración hepática de Ac-CoA. Esta situación metabólica se asemeja a la que se presenta en animales obesos y concuerda con el predominio de acúmulo de grasas descrito en el hipotiroidismo.

Existen factores comunes en estas situaciones experimentales. Así, en todas ellas, se presenta una activación de la gluconeogénesis (posiblemente acompañada de una inhibición de la glucólisis), una activa glucogenólisis y una inhibida lipogénesis.

Es curioso observar la falta de correlación entre los niveles de Ac-CoA y ácido cítrico y las vías metabólicas anteriormente citadas. Según se ha descrito, una elevación en el Ac-CoA y el cítrico deben acompañar a una aumentada gluconeogénesis, al ser el primero activador del primer enzima de la gluconeogénesis: la piruvato carboxilasa, y el segundo inhibidor de un enzima

glicolítico: la fosfofructokinasa. Así pues, estos resultados demuestran que el mantenimiento de una aumentada gluconeogénesis no requiere necesariamente la presencia de concentraciones apropiadas de dichos reguladores alostéricos.

El mismo razonamiento podría hacerse para el caso de la lipogénesis, la cual es activada por el ácido cítrico que actúa alostéricamente sobre la Ac-CoA carboxilasa. Una disminución de la lipogénesis hemos visto que puede presentarse en presencia de niveles normales de ácido cítrico hepático (animales lactantes alimentados), e incluso en presencia de unos altos niveles de dicho metabolito (ratas lactantes en ayunas).

Otro punto interesante que puede deducirse del presente estudio se refiere al crítico papel que ejerce la reacción catalizada por la cítrico sintetasa en el destino metabólico del Ac-CoA. A través de esta reacción, en condiciones basales, el Ac-CoA se acopla al oxalacético para entrar en el ciclo de Krebs en forma de ácido cítrico. Para llevarse a cabo esta reacción se requiere, no sólo la presencia de una suficiente actividad del enzima, sino la de los sustratos correspondientes. Aquí hemos visto por ejemplo, que cuando falta oxalacetato, por estarse utilizando más rápidamente para la gluconeogénesis, los niveles de ácido cítrico hepático disminuyen ya que el Ac-CoA escapa del ciclo de Krebs para ir a formar cuerpos cetónicos. Este es el caso de los ani-

males adultos normales y de 30 días de edad, sometidos al ayuno, en los que una activación de la gluconeogénesis viene acompañada de una activa cetogénesis y de una disminución de la concentración hepática de ácido cítrico. Como hemos visto aquí, también puede darse el caso de que unas activas gluconeogénesis y cetogénesis no se presenten junto con una bajada de ácido cítrico, como ocurre en el caso de las ratas lactantes alimentadas. En esta situación, el panorama metabólico podría explicarse por una formación aumentada de oxalacetato y Ac-CoA, suficiente para mantener una elevada gluconeogénesis y una síntesis normal de ácido cítrico, al mismo tiempo que una aumentada cetogénesis. Esta situación parece lograrse a expensas de una abundante oxidación de grasas en el hígado, como hemos demostrado aquí, y una activa síntesis de oxalacetato a partir de proteínas, como lo sugeriría el hecho de que la actividad aspartato transaminasa se ha descrito que está aumentada en el hígado de estos animales.

Podrían achacarse estos cambios en la encrucijada de cítrico-acetil-CoA-cuerpos cétonicos, a alteraciones en los niveles periféricos de insulina. De hecho, se sabe que los bajos niveles de ácido cítrico y la aumentada concentración de Ac-CoA y de cuerpos cetónicos circulantes que se presentan en el animal adulto en ayunas (donde los niveles de insulina están disminuidos), se revierten a la normalidad a los pocos minutos de la inyección

de insulina (Herrera y Freinkel, 1968). Sin embargo, no siempre éste es el caso, ya que unos bajos niveles circulantes de dicha hormona pueden presentarse junto a un estado estacionario de metabolitos hepáticos totalmente normal, como sucede en los animales hipotiroideos, y por el contrario, unos niveles altos de insulina pueden darse junto a una aumentada liberación periférica de grasas y un estado estacionario de metabolitos hepáticos totalmente normal, como sucede en el caso de las ratas hipertiroideas.

No podemos descartar la posibilidad de que estos efectos se deban a los cambios conjuntos de otras hormonas, además de la insulina, que acompañan a estas situaciones experimentales. De hecho aquí hemos visto que algunas de las hormonas hipofisarias cambian de distinta forma según la condición experimental estudiada.

RESUMEN

Y

CONCLUSIONES FINALES

1- En la presente tesis hemos estudiado los mecanismos de regulación de las interrelaciones hidratos de carbono/grasas; para ello hemos utilizado como modelos experimentales ratas lactantes, hipo e hipertiroides, tanto alimentadas como en ayunas.

2- El aumento del tamaño del hígado en las ratas lactantes es más lento que el del peso corporal (de tal modo que hasta los 20 días la relación peso del hígado/peso corporal no se normaliza), lo que se debe a grandes cambios en el número y tamaño de los hepatocitos. Un tiempo crítico en el desarrollo del hígado lo hemos encontrado a los 10 días del nacimiento, a partir de los cuales se presenta una activación de la división celular. Al mismo tiempo, a dicha edad el ayuno produce una degradación hepática que repercute en un mayor descenso de los componentes intrínsecos del hígado que en otras edades (proteínas, agua, fosfolípidos), e incluso una pérdida de DNA, el cual no varía en el hígado de los otros grupos estudiados.

3-La concentración hepática de ácidos grasos libres y esterificados, está aumentada en las ratas lactantes, lo que parece ser consecuencia de la abundancia de lípidos de la leche materna y no de una activación de la lipogénesis, que hemos visto que está inhibida en estos animales. El ayuno hace que aumente la concentración hepática de ácidos grasos totales en los animales de 30 días de edad

adultos, como resultado de una activación de la lipólisis en tejido adiposo, mientras que en las ratas más jóvenes no cambia dicho parámetro, posiblemente debido a una falta de reservas grasas y/o a una mayor utilización de los ácidos grasos.

4- La concentración de glucógeno hepático es muy baja en las ratas de 5 días, aumentando progresivamente con la edad a medida que va cambiando la composición de la dieta, que se va haciendo más rica en hidratos de carbono, y por tanto aportando sustrato para la glucogénesis.

5- Cuando las ratas lactantes están alimentadas, los niveles hepáticos de Ac-CoA y ácido cítrico son similares a los de las ratas adultas, mientras que los niveles plasmáticos de cuerpos cetónicos están muy elevados en las primeras.

Tras el ayuno, la elevación de Ac-CoA es menor en las ratas jóvenes que en las adultas, mientras que el ácido cítrico no cambia o incluso aumenta durante la lactancia. Este último resultado es contrario al que se presenta normalmente, ya que en las ratas adultas el ácido cítrico disminuye con el ayuno. A pesar de ello, el aumento de cuerpos cetónicos es máximo en las ratas más jóvenes. Todos estos cambios pueden ser explicados gracias a la abundancia de lípidos en las ratas jóvenes, que pueden oxidarlos en mayor proporción tras el ayuno y a una disponibilidad de oxalacetato

en esta situación alimenticia, debido a una falta de activación en la utilización de este metabolito para la síntesis de glucosa.

6- La gluconeogénesis "in vivo" está aumentada en las ratas lactantes, lo cual puede estar facilitado por un potencial citoplásmico más reducido, como lo indica el aumento de la relación láctico/pirúvico en estos animales. Tras el ayuno la actividad gluconeogénica no aumenta en las ratas más jóvenes estudiadas, mientras que en las de mayor edad hay una activación significativa de esta vía metabólica. Esta situación en las ratas lactantes es comparable a la que aparece en las adultas alimentadas con una dieta rica en grasas y por consiguiente, puede explicarse por la abundancia de lípidos que existe en la leche.

7- Todos estos cambios metabólicos permiten que el animal lactante consiga unos niveles aceptables de glucosa, a pesar del mínimo aporte de carbohidratos en la dieta. La posibilidad de utilizar lípidos en gran cantidad permite un ahorro de glucosa que especialmente se pone de manifiesto en los animales de 20 días, en los que dicho parámetro no cambia con el ayuno gracias a los efectos yuxtapuestos de una activa cetogénesis y un aumento en la disponibilidad de hidratos de carbono en la dieta.

8- Algunas de las alteraciones que aparecían en

la lactancia, se presentan de forma similar en ratas hipotiroideas sometidas al ayuno y posiblemente, son inducidas también por un aumento de los lípidos disponibles, ya que aunque en estos animales hay una disminución del ritmo anabólico y catabólico, el acúmulo de grasas está favorecido en el hipotiroidismo cuando los animales están alimentados.

9- El hipotiroidismo intenso se ha logrado sometiendo a ratas tiroidectomizadas a una dieta pobre en iodo y se manifiesta por una drástica bajada de los niveles circulantes de hormonas tiroideas, un aumento de la tirotrófica plasmática y una detención del crecimiento.

10- Los cambios más intensos de los parámetros estudiados en las ratas tiroidectomizadas se presentan cuando estos animales se someten al ayuno. En estas condiciones, aparecen niveles de ácido cítrico hepático y cuerpos cetónicos circulantes más altos que en los animales controles, mientras que en los de Ac-CoA no hay diferencia entre los dos grupos y los niveles de glucosa circulante y glucógeno hepático están francamente disminuidos.

11- No todas las alteraciones metabólicas que presentan las ratas tiroidectomizadas pueden achacarse exclusivamente a la disminución de hormonas tiroideas disponibles, ya que hemos visto que en estos animales aparecen cambios en otras glándulas, tales como la hipófisis y el páncreas,

cuyas hormonas afectan directamente el metabolismo intermedio.

12- La administración de pequeñas cantidades de tiroxina ($0.1 \mu\text{g}$ de $T_4/100 \text{ g}$ de peso/día) a animales tiroidectomizados hace desaparecer parte de las alteraciones metabólicas del hipotiroidismo intenso, sin alterar los niveles circulantes de TSH. Esto sugiere una distinta sensibilidad de los diferentes parámetros aquí estudiados a las hormonas tiroideas y viene apoyado por el hecho de que dosis de T_4 suficientes para normalizar totalmente el crecimiento y la mayor parte de los parámetros estudiados ($2 \mu\text{g}$) hacen que los animales presenten unos niveles circulantes de insulina aumentados y como consecuencia, disminuidos de glucosa plasmática.

13- La administración diaria de $25 \mu\text{g}$ de tiroxina a ratas tiroidectomizadas, produce un hipertiroidismo que se manifiesta en unos altos niveles de hormonas tiroideas circulantes y una disminución del TSH en plasma. Estos animales presentan una pérdida de peso corporal que no se debe a un menor crecimiento (lo que viene apoyado por el hecho de un contenido hipofisario de GH normal), sino a un catabolismo acelerado.

14- El estado estacionario de los distintos metabolitos aquí estudiados es normal, con la excepción de una

disminución de la concentración hepática de glucógeno, como consecuencia de una gran glucogenolisis, y de un aumento de la glucemia. A pesar de este cuadro diabético, los niveles plasmáticos de insulina son muy altos, lo que sugiere una elevada resistencia a la insulina en las ratas hipertiroideas.

15- La respuesta al ayuno está muy disminuída en estos animales, como lo demuestra la ausencia de cambio en los niveles de Ac-CoA, ac. cítrico y ac. grasos hepáticos y el menor aumento en los cuerpos cetónicos circulantes, así como el mantenimiento de la hiperglucemia e hiperinsulinemia. Posiblemente esta aminorada respuesta al ayuno se debe a una falta de movilización de lípidos, no por una disminución de la actividad lipolítica del tejido adiposo, sino por una carencia de suficientes depósitos grasos, como consecuencia del acelerado catabolismo al que estaban sometidos estos animales cuando se encontraban alimentados "ad libitum".

16- Del presente estudio en animales sometidos a distintas condiciones experimentales podemos concluir que un aumento en la llegada de lípidos al hígado puede afectar de diferente manera el estado estacionario de distintos metabolitos, dependiendo de la forma de utilización de éstos. Parecen, sin embargo, existir factores comunes en estas situaciones de abundancia de grasas, como son una activación

de la gluconeogénesis, una elevada glucogenolisis y una inhibida lipogénesis.

17- No existe, sin embargo, correlación entre el estado estacionario de algunos metabolitos reguladores de tipo alostérico y la actividad de las vías sobre las que se ha descrito que actúan. Esto hace sospechar del papel fisiológico que estos mecanismos, descritos en condiciones de enzimas purificadas, puedan jugar en el animal "in vivo".

18- Por último, hemos de destacar el importante papel que parece jugar la reacción catalizada por la citrato sintetasa en la regulación de la encrucijada metabólica de lípidos e hidratos de carbono, ya que puede dirigir la utilización del oxalacetato para la síntesis de ácido cítrico y/o para la síntesis de glucosa y la del Ac-CoA para entrar en el ciclo de Krebs, para la lipogénesis y/o para la cetogénesis y de esta forma lograr regular el equilibrio entre el metabolismo hidrocarbonado y el graso en el hígado.

BIBLIOGRAFIA

AUGENFELD, J., y FRITZ, I.B.: Can. J. Biochem., 48, 288,
1970

AVDALOVIC, N., RUKAVINA, D. y EBERHARDT, P.: Proc. Soc.
Exp. Biol. Med., 134, 943, 1970

BALLARD, F.J. y HANSON, R.W.: Biochem. J., 102, 952,
1967

BALLARD, F.J. y HANSON, R.W.: Biochem. J., 104, 866,
1967

BALLARD, F.J. y OLIVER, I.T.: Biochim. Biophys. Acta 71,
578, 1963

BAILEY, E. y LOCKWOOD, E.A.: Biochem J., 124, 7p, 1971

BAKER, N., SHIPLEY, R.A., CLARK, R.E. y INCEFY, G.E.,
Am. J. Physiol., 196, 245, 1959

BARGONI, N., GRILLO, M.A., RINAUDO, M.T. y FOSSA, T.:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 349, 275, 1968

BATES, M.W., ZOMZELY, C. y MAYER, J.: Endocrinology, 57
505, 1955

BENOTTI, J. y BENOTTI, N.: Clin. Chem., 6, 408, 1963

BESSMAN, S.P. y ANDERSON, M.: Federation Proc., 16, 154, 1957

BIRGE, C.A., PEAKE, G.T., MARIZ, I.K. y DAUGHADAY, W. H.: Endocrinology, 81, 195, 1967

BLAZQUEZ, E., CASTRO, M. y HERRERA, E.: R. Esp. Fisiol.: 27, 297, 1971

BLAZQUEZ, E., MONTOYA, E. y LOPEZ-QUIJADA, C.: J. Endocr. 48, 553, 1970

BÖTTGER, I., KRIEGEL, H. y WIELAND, O.: Eur. J. Biochem., 13, 253, 1970

BRAY, G.A. y GOODMAN, H.M.: Endocrinology, 82, 860, 1968

BRESSLER, R. y WITTELS, B.: J. Clin. Invest., 45, 1326, 1966

BRODIE, B.B., DAVIES, J.I., HYNIE, S., KRISHNA, G. y WEISS, B.: Pharmacol. Rev., 18, 273, 1966

BROWN, J.H. y BARKER, S.B.: En "Basic Endocrinology", F. A. Davis. Co., Philadelphia, p., 219, 1966

BURTON, A.F., GREENALL, R.M. y TURNELL, R.W.: Can. J. Biochem., 48, 178, 1970

CASTRO, M.: Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Madrid, 1972

CASTRO, M., LAMAS, L. y HERRERA, E.: Acta Endocrinológica, 69, 1, 1972

CHRISTOPHE, J.: En "Contribution à la Biochimie des Obésités Experimentales", p. 55, Ed. Arscia, Bruselas, 1961

COGGESHALL, H.C. y GREENE, J.A.: Amer. J. Physiol., 105, 103, 1933

COHEN, A.M.: Amer. J. Physiol., 188, 287, 1957

DAUGHADAY, W.H., PEAKE, G.T., BIRGE, C.A. y MARIZ, I.K.: Proc. First Int. Symposium Growth Hormone, Excerpta Medica (Amst.), Int. Congr. Ser., 158, 238, 1968

DAWKINS, M.J.R.: Brit. Med. Bull., 22, 27, 1966

DEBONS, A.F. y SCHWARTZ, I.L.: J. Lipid. Res., 2, 86, 1961

DORSEY, J.A. y PORTER, J.W.: J. Biol. Chem., 243, 3512, 1968

DOW, D.S. y ALLEN, C.E.: Canad. J. Biochem.: 39, 981, 1961

DRAHOTA, Z., HAHN, P., MOUREK, J. y TROJANOVA, M.: *Physiologia bohemoslov*, 14, 134, 1965

DRAHOTA, Z., HAHN, P., KLEINZELLER, A. y KOSTOLANSKA, A.: *Biochem. J.*, 93, 61, 1964

DUNCOMBE, W.G.: *Biochem. J.*, 88, 7, 1963

DYMSZA, H.A., CZAJKA, D.M. y MILLER, S.A.: *J. Nutr.*, 84, 100, 1964

ELGEE, N.J. y WILLIAMS, R.M.: *Amer. J. Physiol.*, 180, 13, 1955

ESCOBAR DEL REY, F., MORREALE DE ESCOBAR, G., JOLIN, T. y LOPEZ-QUIJADA, C.: *Endocrinology*, 83, 41, 1968

FISHER, J.N. y BALL, E.G.: *Biochemistry*, 6, 637, 1967

FISKE, C.H. y SUBBAROW, Y.: *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925

FOLCH, J., LEES, M. y STANLEY, G.H.S.: *J. Biol. Chem.* 226. 497, 1957

FREEDLAND, R.A. y KREBS, H.A.: *Biochem. J.*, 104, 45 p., 1967

FREINKEL, N. y METZGER, B.E.: En "The Thyroid", p. 574.

Ed por Werner, S.C. y Ingbar, S.H., New York: Harper and Row, 1971

GARCIA, M.D. y MORREALE DE ESCOBAR, G.: Abstract nº 129 del VI Congreso Internacional de Tiroides, Viena (Austria) Junio 1970

GARLAND, P.B. y RANDLE, P.J.: Biochem. J., 91, 6c, 1964

GIRARD, J., BAL, D. y ASSAN, R.: Horm. Metab. Res., 4, 168, 1972

GOOD, C.A., KRAMER, H. y SOMOGYI, M.: J. Biol. Chem, 100, 485, 1933

GRIESBACH, W.E. y PURVES, H.D.: Brit. J. Exp. Path., 26, 13, 1945

HAHN, P., KOLDOVSKY, O., MELICHAM, V. y NOVAK, M.: Nature, 192, 1296, 1961 a

HAHN, P., KOLDOVSKY, O., KRECEK, J., MARTINEK, J. y VACEK, Z.: Somatic Stabil. Newly Born, Ciba Found, Symp., 1961, pag. 131, 1961 b

HALES, C.N. y HYAMS, D.E.: Lancet, 2, 69, 1964

HALES, C.N. y RANDLE, P.J.: Biochem. J., 88, 137, 1963

HAMBURGER, J., SMITH, R.W. Jr. y MILLER, J.M.: Metabolism, 12, 821, 1963

HARLAN, W.R., LASZLO, J., BOGDONOFF, M.D. y ESTES, E.H. Jr.: J. Clin. Endocr., 23, 33, 1963

HARPER, H.A.: En "Manual de Química Fisiológica", p. 160. Ed. Manual Moderno, Mexico, 1969

HELLMAN, L., BRADLOW, H.L., ZUMOFF, B., FUKUSHIMA, D.K. y GALLAGHER, T.F.: J. Clin. Endocr., 19, 936, 1959

HERRERA, E., ESCOBAR DEL REY, F. y MORREALE DE ESCOBAR, G.: Endocrinology, 73, 744, 1963

HERRERA, E., ESCOBAR DEL REY, F. y MORREALE DE ESCOBAR, G.: Acta Endocrinológica, 59, 529, 1968 a

HERRERA, E. y FREINKEL, N.: J. Lipid. Res., 8, 515, 1967

HERRERA, E. y FREINKEL, N.: Biochim. Biophys. Acta 170, 244, 1968

HERRERA, E., MORREALE DE ESCOBAR, G. y ESCOBAR DEL REY, F.: Endocrinology, 83, 671, 1968 b

HERRERA, E., KNOPP, R.H. y FREINKEL, N.: J. Clin. Invest.
48, 2260, 1969

HERRERA, E. y LAMAS, L.: Bioch. J., 120, 433, 1970

HO, R.J. y MENG, G.H.: Anal. Biochem., 31, 426, 1969

HORRST, H.J.: En "Methods of Enzymatic Analysis", p. 266,
Ed. por Bergmeyer, H.U., Academic Press, New York and
London

HORNBROOK, K.R., QUINN, P.V., SIEGEL, J.H. y BRODY, T.M.:
Bioch. Pharmacol., 14, 925, 1965

HUGGETT, A. St. G. y NIXON, D.A.: Lancet, 2, 368, 1956

JOLIN, T., MORREALE DE ESCOBAR, G. y ESCOBAR DEL REY, F.:
Endocrinology, 87, 99, 1970

JONES, A.E., FISHER, J.N., LEWIS, W.J. y VANDERLAAN, W.P.:
Endocrinology 76, 578, 1965

KEECH, D.B. y UTTER, M.F.: J. Biol. Chem., 238, 2603,
1963

KORNFELD, R. y BROWN, D.H.: J. Biol. Chem., 238, 1604,
1962

KURIYAMA, S.: J. Biol. Chem., 33, 193, 1918

LAMBERG, B.A.: Acta Med. Scand., 178, 351, 1965

LEE, L.P.K. y FRITZ, I.B.: Can. J. Biochem. 49, 599, 1971

LEVINE, R.: Metabolism, 2, 375, 1953

LEVINE, S. y MULLINS, R.F. Jr.: Science, 152, 1585, 1966

LEWIS, V.J., CHEEVER, E.V. y VANDERLAAN, W.P.: Endocrinology, 76, 362, 1965

LOCKWOOD, E.A. y BAILEY, E.: Biochem, J., 120, 49, 1970

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J.: J. Biol. Chem., 193, 265, 1951

MALAISSSE, W.J., MALAISSSE-LAGAE, F. y MACCRAW, E.F.: Diabetes, 16, 643, 1967

MARTIN, D.B. y VAGELOS, P.R.: Biochim. Biophys., Acta 7, 101, 1962

MASORO, E.J.: J. Lipid. Res., 3, 149, 1962

MENAHAN, L.A. y WIELAND, O.: Eur. J. Biochem., 10, 188, 1969

METZGER, B.E. y FREINKEL, N.: En "The Thyroid" Ed. por Werner, S.C. e Ingbar, S.H., New York, Harper y Row, p. 744, 1971

MOELLERING, H. y GRUBER, W.: Anal. Biochem. 17, 369, 1966

MONTOYA, E.: Tesis doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Madrid, 1972

MURAD, S. y FREEDLAND, R.A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 124, 1176, 1967

MYANT, N.B. y ILIFFE, J.: En "Control of lipid metabolism" Ac. Press. Ed. J.K. Grant, p. 145-154, 1963

ORSETTI, A., BASSERES, J. y MACABIES, J.: J. Physiol, (Paris), 59 (Supl. 1), 276, 1967

OWEN, D.E., FELIG, P., MORGAN, A.P., WAHREN, J. y CAHILL, G.F. Jr.; J.Clin. Invest., 48, 574, 1969

PAGE, M.A., KREBS, H.A. y WILLIAMSON, D.H.: Biochem. J., 121, 49, 1971

PASSONNEAU, J.V. y LOWRY, O.H.: Biochem, Biophys. Res. Commun., 13, 372, 1963

PHILIPPIDIS, H. y BALLARD, F.J.: Biochem. J., 113, 651, 1969

PURVES, H.D.: En "The Thyroid Gland", vol. 2, Pitt-Rivers, R. y Trotter, W.R. (Eds), Butterworths, Londres, p. 1, 1964

RABINOWITZ, J.L. y MYERSON, R.M.: Metabolism, 16, 68, 1967

REMINGTON, R.E. y LEVINE, H.: J. Nutr. 11, 343, 1936

REMINGTON, R.E.: J. Nutr. 13, 223, 1937

SANDLER, R., HERRERA, E. y FREINKEL, N.: Clinical Research 16, 351, 1968

SCHMIDT, G. y THANNHAUSER, S.J.: J. Biol. Chem. 161, 83, 1945

SCOW, R.O.: Endocrinology 49, 522, 1951

SHAMES, D., BERMAN, M y SEGAL, S.: J. Clin. Invest. 47, 89a, 1968

SOMOGYI, M.: J. Biol. Chem. 160, 69, 1945

STAUFFACHER, W., LAMBERT, A.E., VECCHIO, D. y RENOLD, A.

E.; Diabetología 3, 230, 1967

STERLING, K.: Mayo Clinic Proceedings 39, 586, 1964

SVEDMYR, N.: Acta Physiol. Scand. 68: Supplement 274, 1966

SZEPESI, B. y FREEDLAND, R.A.: Am. J. Physiol. 216,
1054, 1969

TAYLOR, C.B., BAILEY, E. y BARTLEY, W.: Biochem. J. 105,
717, 1967

VAUGHAN, M.: J.Clin. Invest. 46, 1482, 1967

VANDRELY, R.: En "The Nucleic Acids", Vol. 11, Academic
Press p. 155, 1955

VERNON, R.G. y WALKER, D.G.: Biochem. J. 106, 321, 1968

VERNON, R.G. y WARKER, D.G.: Biochem. J. 127, 521, 1972 a

VERNON, R.G. y WARKER, D.G.: Biochem. J. 127, 531, 1972 b

VILLEE, C.A.: Proc. 2nd Josiah Found. Conf.: Physiology
of Prematurity p. 29, 1958

WALKER, D.G. y HOLLAND, G.: Biochem. J. 97, 845, 1965

WEBER, G. y CANTERO, A.: Endocrinology 61, 701, 1957

WEBER, G., HIRD CONVERY, H.J., LEA, M.A. y STAMM, N.B.:
Science 154, 1357, 1966

WILLIAMSON, D.H., LUND, P. y KREBS, H.A.: Bioch. J. 103,
514, 1967

WINNICK, S.: Endocrinology 87, 124, 1970

YALOW, R.S. y BERSON, S.A.: J. Clin. Invest. 39, 1157,
1960

YEUNG, D. y OLIVER, I.T.: Biochem. J. 103, 744, 1967

YEUNG, D. y OLIVER, I.T.: Biochem. J. 105, 1229, 1967

ZAK, B., WILLAR, H.H., MYERS, G.B. y BOYLE, A.J.: Anal.
Chem. 24, 1345, 1952

ZARROW, M.Y., YOCHIN, J.M. y MCCARTHY, J.L.: En "Experi-
mental Endocrinology", Academic Press, New York y Lon-
dres, p. 240, 1964

ZORZOLI, A., TURKENKOPF, I.J. y MUELLER, V.L.: Biochem.
J. 111, 181, 1969